



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN

Y DESARROLLO HUMANO DE GALICIA

**PATRÓN GENÉTICO DE LA HIPOLACTASIA DE TIPO
ADULTO EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES DE
GALICIA**

ADINA VALERIA TOCOIAN

Santiago de Compostela

2006

Profesor Doctor Rafael Tojo Sierra, Catedrático de Pediatría y Director del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

Profesora Doctora Rosaura Leis Trabazo, Profesora Titular de Pediatría del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

Doctora Lourdes Loidi Fernández de Troconiz, Jefa de Laboratorio de la Fundación de Medicina Xenómica de Santiago de Compostela.

HACEMOS CONSTAR: que la licenciada en Medicina y Cirugía Dña. Adina Valeria Tocoian ha realizado el presente trabajo de investigación “PATRÓN GENÉTICO DE LA MALABSORCIÓN A LA LACTOSA DE TIPO ADULTO EN LOS NIÑOS Y LOS ADOLESCENTES DE GALICIA” bajo nuestra dirección. Una vez finalizado, consideramos reúne las condiciones estipuladas para ser presentado como Memoria de Tesis Doctoral, para optar al Grado de Doctor y la autorizamos para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, España, a 8 de septiembre de 2006.

Fdo.: Prof. Dr. Rafael Tojo Sierra

Fdo.: Prof. Dra. Rosaura Leis Trabazo

Fdo.: Dra. Lourdes Lloidi Fernández de Troconiz

AGRADECIMIENTOS:

Agradecimientos para mis directores de tesis: Prof. Dr. Rafael Tojo Sierra, Prof. Dra. Rosaura Leis Trabazo y Dra. Lourdes Loidi Fernández de Troconiz, por el gran interés mostrado en la dirección de la tesis.

A todos los miembros de la Unidad de Nutrición y Metabolismo Pediátrico del Departamento de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, en el que se ha realizado el presente estudio, por su apoyo y su colaboración. A Ana Martínez Lorente por su compañerismo, amistad y cariño. A Susi Novo Ares por su trabajo de enfermería.

Al Dr. Christopher Phillips, a la Dra. Maria Torres Español, a la Dra. Celsa Quinteiro García, a Inés Quintela García, a Marga Formoso Leis, a Rocío González Bouzón y a Silvia Parajes Castro de la Unidad de Medicina Molecular, por haberme ayudado en la realización del estudio genético y por haberme iniciado en las técnicas de medicina molecular.

Al Prof. Dr. Fernando Tato Herrero y al Dr. Carlos Rodríguez Moreno, por el apoyo incondicional que han aportaron en la finalización de este trabajo, por sus consejos y sus correcciones.

Al Prof. Dr. Manuel Paz y al Dr. Francisco Gude por su asesoramiento y colaboración en la estadística de los resultados.

Al Prof. Dr. Fernando Domínguez Puente y a Lidia Castro Feijoo por haberme apoyado en los momentos difíciles de la tesis.

A mis padres, a mis amigos y a mis compañeros por haber aguantado mis problemas profesionales y por confortarme con sus palabras. Sin su apoyo este trabajo no podría haberse realizado.

Por último, mi más sincero agradecimiento a todos los niños participantes en el estudio y a los miembros de las familias afectadas por su colaboración. Gracias.

“Mi visión del nuevo hombre es la de un rebelde, la de un hombre que está buscando su ser original. Un hombre que está preparado para renunciar a todas las máscaras, todas las pretensiones, todas las hipocresías y mostrarle al mundo quién es en realidad. No importa que te amen o que te critiquen, te respeten, te honren o te difamen, que te coronen o que te crucifiquen; porque la mayor bendición que hay en la existencia es ser tú mismo.”

OSHO (1931-1990)

ÍNDICE

Índice.....	5
Justificación	11
Objetivos	12
Glosario de acrónimos	13
Terminología empleada en el test de hidrógeno espirado.....	14
 1. INTRODUCCIÓN.....	 15
1.1. Malabsorción a la lactosa.....	17
1.1.1. Lactosa.....	17
1.1.1.1. Estructura química y características de la lactosa	17
1.1.1.2. Usos de la lactosa	19
1.1.1.3. Valor nutritivo de la lactosa	19
1.1.2. El enzima lactasa y su regulación.....	20
1.1.3. Definición de la malabsorción a la lactosa y los tipos de hipolactasia.....	23
1.2. Déficit de lactasa de tipo adulto.....	26
1.2.1. Prevalencia del déficit de lactasa de tipo adulto en el mundo, en España y en Galicia	27
1.2.2. Edad de aparición de la hipolactasia de tipo adulto.....	30
1.2.3. La relación entre la hipolactasia de tipo adulto y el sexo	32
1.2.4. Consideraciones genéticas de la hipolactasia de tipo adulto	33
1.2.5. Teoría evolucionista del déficit de lactasa de tipo adulto.....	36
1.2.6. Diagnóstico diferencial de la hipolactasia de tipo adulto	40
1.2.7. Patologías asociadas con el déficit de lactasa de tipo adulto.....	41
1.2.8. Sintomatología e intolerancia a la lactosa.....	43
1.2.9. Métodos diagnósticos del déficit de lactasa de tipo adulto.....	50
1.2.10. Tratamiento del déficit de lactasa de tipo adulto	55
1.2.10.1. Propuestas para el manejo terapéutico	55
1.2.10.2. Estrategias terapéuticas	57
1.2.10.2.1. Beta galactosidasa	57
1.2.10.2.2. El yogur y los prebióticos	59

MATERIAL y MÉTODO.....	61
2. MATERIAL.....	63
2.1. Muestra de niños estudiada en el año 2003	63
2.1.1. Distribución de la muestra del 2003 según el sexo y de la edad.....	63
2.1.2. Distribución de la muestra del 2003 según los motivos de consulta	63
2.1.3. Distribución de la muestra del 2003 según el resultado del BH ₂ T post 2 g lactosa/kg peso (< 50 g).....	63
2.2. Muestra de niños estudiada en los años 2004-2005.....	65
2.2.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el sexo.....	65
2.2.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según la edad	65
2.2.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el motivo de la consulta	65
2.2.4. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el fenotipo obtenido en el BH ₂ T.....	65
2.2.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los síntomas presentados durante el BH ₂ T.....	68
2.2.6. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los motivos de consulta y los síntomas presentados durante el BH ₂ T.....	69
2.2.7. Distribución de los fenotipos obtenidos por el BH ₂ T, de la muestra del período 2004-2005, según la edad	69
2.3. Controles gallegos	70
2.4. Controles de otras nacionalidades.....	70
3. MÉTODO	70
3.2.1. Historia clínica	71
3.2.1.1. Los antecedentes personales.....	71
3.2.1.2. Los antecedentes heredo-colaterales	71
3.2.2. Estudio antropométrico.....	71
3.2.3. Encuesta alimentaria	71
3.2.4. Test de hidrógeno espirado	71
3.2.4.1. Justificación del test	71
3.2.4.2. Factores que originan falsos negativos	72
3.2.4.3. Factores que originan falsos positivos	73
3.2.4.4. Preparación antes del procedimiento	75
3.2.4.5. Sistema de recogida de muestras para el BH ₂ T.....	75
3.2.4.6. Sistema de medida de la concentración de hidrógeno.....	76

3.2.5. Estudios genéticos	76
3.2.5.1. Extracción del ADN genómico a partir de 300 µL de sangre fresca	76
3.2.5.2. Determinación de los genotipos	77
3.2.5.2.1. PCR y secuenciación.....	77
3.2.5.2.2. Sequenom.....	78
3.2.6. Análisis estadístico	85
3.2.6.1. La sensibilidad	85
3.2.6.2. La especificidad	86
3.2.6.3. El valor predictivo positivo.....	86
3.2.6.4. El valor predictivo negativo.....	86
3.2.6.5. Razón de verosimilitud	86
4. RESULTADOS.....	87
4.1. Muestra de niños del período 2004-2005	89
4.1.1. Perfil fenotípico de la muestra de niños del período 2004-2005.....	89
4.1.1.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH ₂ T y la edad	89
4.1.1.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH ₂ T y el sexo.....	90
4.1.1.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por BH ₂ T y los motivos de consulta	91
4.1.1.4. Distribución de la muestra 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH ₂ T y los síntomas durante el BH ₂ T	92
4.1.1.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los motivos de consulta y los síntomas durante el BH ₂ T	93
4.1.2. Perfil genotípico de la muestra de niños del período 2004-2005	95
4.1.2.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo de ambos SNPs: C/T-13910 y G/A-22018	95
4.1.2.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el polimorfismo C/T-13910.....	96
4.1.2.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el polimorfismo G/A-22018	96
4.1.2.4. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y la edad.....	97
4.1.2.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y el sexo	98

4.1.2.6. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y los síntomas presentados durante el BH ₂ T	99
4.1.2.6.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y el número de síntomas presentados durante el BH ₂ T	99
4.1.2.6.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y el tipo de síntomas presentados durante el BH ₂ T	100
4.1.2.7. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los síntomas-motivo de consulta y los síntomas presentados durante el BH ₂ T, en los niños con el polimorfismo C/T-13910.....	101
4.1.2.8. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los síntomas-motivo de consulta y los síntomas presentados durante el BH ₂ T, en los niños con el polimorfismo G/A-22018	102
4.1.3. La correlación fenotipo-genotipo en la muestra del 2004-2005	103
4.1.3.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH ₂ T y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018.....	103
4.1.3.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH ₂ T y el genotipo C/T-13910	104
4.1.3.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH ₂ T y el genotipo G/A-22018.....	105
4.1.3.4. Descripción de los casos con resultados discrepantes entre el test ADN y el BH ₂ T	107
4.1.4. La evaluación de la validez y de la seguridad de la prueba genética para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en los niños gallegos.....	109
4.1.4.1. La validez de los dos polimorfismos juntos (C/T-13910 y G/A-22018) para diagnosticar la malabsorción a la lactosa	109
4.1.4.2. La validez del polimorfismo C/T-13910 para diagnosticar la malabsorción a la lactosa.....	109
4.1.4.3. La validez del polimorfismo G/A-22018 para diagnosticar la malabsorción a la lactosa.....	110
4.1.4.4. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los SNP C/T-13910 y G/A-22018 para diagnosticar la malabsorción a la lactosa	110
4.1.5. Distribución alélica de los SNPs C/T-13910 Y G/A-22018 en la población	
4.1.6. Distribución de la muestra de 134 niños genotipados en 3 grupos de edad, utilizando el SNP C/T-13910 pediátrica gallega estudiada.....	113

4.1.6.1. Grupo 2-5 años	113
4.1.6.2. Grupo 6-11 años	114
4.1.6.3. Grupo >12 años	115
4.1.6.4. Comparación entre los 3 grupos de edad.....	116
4.1.7. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018.....	117
4.1.7.1. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018 juntos	117
4.1.7.2. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo C/T-13910.....	118
4.1.7.3. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos G/A-22018	119
4.1.7.4. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos, para diagnosticar la intolerancia a la lactosa	120
4.2. Controles gallegos.....	121
4.2.1. Estudio de las frecuencias alélicas de los polimorfismos C/T-13910 y G/A- 22018 en la población general gallega	121
4.2.2. Perfil genotípico de la población general gallega	121
4.3. Controles de otras nacionalidades	123
4.3.1. Perfil genotípico en las muestras de noruegos y griegos.....	123
4.3.2. Perfil genotípico en las muestras de Mozambique y Taiwán	124
5. DISCUSIÓN.....	125
5.1. Discusión sobre la prevalencia de la malabsorción a la lactosa en Galicia	126
5.2. Discusión sobre los resultados del test genético en comparación con el BH ₂ T, para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en la muestra de 134 niños genotipados.....	128
5.3. Descripción de los casos con resultados discrepantes entre el test ADN y el BH ₂ T en el diagnóstico de la malabsorción de la lactosa, en la muestra de 134 genotipados	132
5.4. Discusión sobre los resultados del test genético para diagnosticar la hipolactasia de tipo adulto en función de la edad.....	134
5.5. Utilidad del test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en la población general gallega, en comparación con otros grupos poblacionales	138

5.5.1. El test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en la población general gallega	138
5.5.2. El test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en muestras de Noruega, Grecia, Mozambique y Taiwán utilizando las dos variantes.....	139
5.6. Discusión sobre la validez del test genético para diagnosticar la intolerancia a la lactosa durante las 3 horas del BH ₂ T	141
5.7. La interpretación del test genético para diagnosticar la hipolactasia de tipo adulto	142
5.7.1. La interpretación inapropiada del test genético	143
5.7.2. El uso potencialmente apropiado	144
5.7.3. Las ventajas del test genético.....	144
5.7.4. Las desventajas del test genético	145
5.7.5. Conclusiones sobre la interpretación del test genético	145
6. CONCLUSIONES.....	147
7. BIBLIOGRAFÍA.....	151

JUSTIFICACIÓN

La pobre correlación entre síntomas clínicos y malabsorción a la lactosa y la inexactitud de las pruebas indirectas para su diagnóstico (test del hidrógeno espirado) o lo cruento de las pruebas directas (biopsia de la mucosa intestinal), hacen muy necesario un test fiable para la hipolactasia de tipo adulto en la práctica clínica (Järvela-2005, Shaw-1999, Rosado-1984, Arola-1994, Vonk-2000, Swagerty-2002). Por otra parte, dado que se ha demostrado que la hipolactasia del adulto presenta carácter genético, es importante identificar las variantes genéticas responsables.

En el año 2002 se identificaron dos SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms) que parecen estar asociados con la no persistencia de la lactasa (Enattah-2002) condición responsable de la malabsorción a la lactosa. Esta identificación ha motivado la realización de estudios orientados para entender la evolución de la persistencia de la lactasa en los humanos y el origen y la evolución de la mutación responsable de esta persistencia. Los dos SNPs están situados a aproximadamente 14 kb (C/T-13910) y 22 kb (G/A-22018) corriente arriba del gen de la lactasa (LCT) y se heredan ligados, motivo por el cual la mayoría de los estudios realizados hasta ahora se han centrado solamente en el primero de ellos (C/T-13910). Se ha observado que el genotipo CC de este polimorfismo y el genotipo GG del polimorfismo G/A-22018 se relacionan con el fenotipo de malabsorción a la lactosa en la población caucásica finlandesa.

Este planteamiento ha sido motivo de preocupación para muchos grupos de investigadores que han realizado estudios en poblaciones no españolas (Rasinpera-2004, Nilsson-2004, Buning 2005 y Hoegenauer 2005) y que han demostrado que existe una perfecta correlación entre el genotipo C/C-13910 y la baja actividad lactásica (Enattah-2002, Kuokkanen-2003, Rasinperä-2004). Asimismo, se han realizado otros estudios epidemiológicos, moleculares y pruebas funcionales para la variante C/T-13910, implicada en la regulación de la actividad del enzima lactasa (Kuokkanen-2003, Olds-2003, Troelsen-2003). Todos estos avances demuestran que la variante C/T-13910 se puede utilizar para el **test de screening primario de la hipolactasia de tipo adulto en la práctica clínica** (Järvela-2005).

Este *screening* de la hipolactasia de tipo adulto podría ser de enorme interés en el diagnóstico de los síntomas abdominales en poblaciones genéticamente similares a las del norte europeo y en las que la prevalencia de la hipolactasia de tipo adulto es relativamente alta y el consumo de productos lácteos es común. Finalmente, la identificación de la variante creó un nuevo punto de partida para el entendimiento del mecanismo de la reducción de la actividad lactásica (Järvela-2005).

Esta situación justifica la realización de una investigación que permita conocer si es factible utilizar la detección de estos *SNPs* como *screening* diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto en la población gallega, motivo de la presente tesis doctoral.

OBJETIVOS

1. Determinar la frecuencia alélica de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en la población gallega.
2. Estudiar la correlación entre los genotipos de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 y el fenotipo de malabsorción a la lactosa.
3. Estudiar la correlación entre los genotipos de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 y el fenotipo de intolerancia a la lactosa.
4. Investigar la aplicabilidad de las variantes genéticas en el diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto, comparando el test genético con el test de hidrógeno espirado.
5. Comparar datos obtenidos en la población gallega con datos de otras poblaciones.

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

µg: microgramo
µL: microlitro
AA: homocigoto relacionado con la absorción a la lactosa (G/A-22018)
ADN: ácido desoxiribonucleico
AI: absorción e intolerancia a la lactosa
AI: Adequate Intake
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
AT: absorción y tolerancia a la lactosa
BH2T: test de hidrógeno espirado
C/T-13910: polimorfismo situado a 14 kb corriente arriba del gen de la lactasa
CC: homocigoto relacionado con la malabsorción a la lactosa (C/T-13910)
CT: heterocigoto relacionado con la absorción a la lactosa (C/T-13910)
-13910*C: alelo C de la variante C/T-13910, asociado con la malabsorción a la lactosa
-13910*T: alelo T de la variante C/T-13910, asociado con la absorción a la lactosa
DI: deficiente absorción e intolerancia a la lactosa
DT: deficiente absorción y tolerancia a la lactosa
dNTPs: didesoxinucleótido trifosfato
EDTA: ácido acético tetra diamino etilen
FFQ: Food Frequency Questionnaire
G/A-22910: polimorfismo situado a 22 kb corriente arriba del gen de la lactasa
GA: heterocigoto relacionado con la absorción a la lactosa (G/A-22018)
GG: homocigoto relacionado con la malabsorción a la lactosa (G/A-22018)
hME: homogeneous MassExtend reaction
Kcal: kilocaloría
LCT: gen de la lactasa
LPH: la lactasa o la hidrolasa florizin lactasa
Mb: megabase
MI: malabsorción e intolerancia a la lactosa
MT: malabsorción y tolerancia a la lactosa
mL: mililitro
ng: nanogramo
pb: pares de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
pg: picogramo
PM: peso molecular
Ppm: partes por millón
RV: razón de verosimilitud
RVP: razón de verosimilitud positiva
RVN: razón de verosimilitud negativa
REHH: homocigosidad haplotípica relativamente extendida
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
TT: homocigoto relacionado con la absorción a la lactosa (C/T-13910)
VPP: valor predictivo positivo
VPN: valor predictivo negativo

TERMINOLOGÍA EMPLEADA EN EL TEST DE HIDRÓGENO ESPIRADO

(Barr-1981, Sategna-Guidetti-1989, Perman-1978, Douwes-1978, Solomons-1986)

- **Absorción**

Incremento de hidrógeno en el aire espirado menor a 10 ppm, con respecto al nivel basal. Test de hidrógeno espirado negativo.

- **Deficiente absorción**

Incremento de hidrógeno en el aire espirado mayor a 10 ppm y menor a 20 ppm, con respecto al nivel basal.

- **Malabsorción**

Incremento de hidrógeno en el aire espirado mayor o igual a 20 ppm, con respecto al nivel basal. Test de hidrógeno espirado positivo.

- **Intolerancia**

La presencia de síntomas gastrointestinales durante el test de hidrógeno espirado (dolor abdominal, distensión abdominal, diarrea, náuseas, vómito, eructo, flatulencia etc.), con o sin malabsorción.

- **Alteración del metabolismo de la lactosa**

Incremento de hidrógeno en el aire espirado mayor o igual a 10 ppm, con respecto al nivel basal
Deficiente absorción + Malabsorción.

INTRODUCCIÓN

1. 1. MALABSORCIÓN A LA LACTOSA

1.1.1. LACTOSA

1.1.1.1. La estructura química y las características de la lactosa

El disacárido lactosa (β galactosa 1,4 glucosa- C_{12} , H_{22} , O_{11}) (figura 1.1) es el único azúcar presente en la leche de todos los mamíferos (Campbell-2001, Kretchmer-1971) excepto *Pinnepedia*.



Figura 1.1. Fórmula estructural de la lactosa

La cantidad en la que se puede encontrar es variable, siendo por ejemplo en la leche humana no más del 6.7% de ésta, mientras que en la de vaca, aproximadamente un 4.5%. Tiene un PM = 342,3 g/mol, con un porcentaje en peso de C 42,11%, H 6,48% y O 51,41% (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Composición de la leche de diferentes especies (en g por 100).

Nutriente	Vaca	Búfalo	Humano
Agua, g	88,0	84,0	87,5
Energía, kcal	61,0	97,0	70,0
Proteína, g	3,2	3,7	1,0
Grasa, g	3,4	6,9	4,4
Lactosa, g	4,7	5,2	6,9
Minerales, g	0,72	0,79	0,20

Por poseer un grupo aldehídico libre, la lactosa es un azúcar reductor (figura 1.2). Cabe señalar que el poder reductor de la lactosa es más débil que el de la glucosa, pero aumenta considerablemente cuando es hidrolizada.

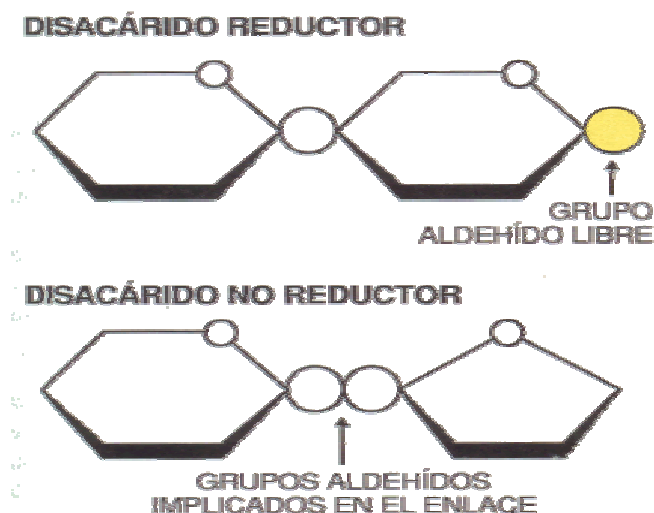
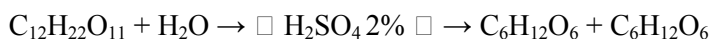


Figura 1.2. La diferencia entre un disacárido reductor y otro no reductor

La hidrólisis de la lactosa es bastante difícil y tiene lugar en medio ácido, aplicando calor (figura 1.3).



Lactosa

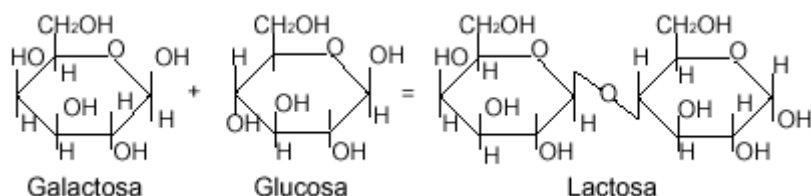
Glucosa Galactosa

1mol lactosa produce 1mol D – glucosa y 1mol D – galactosa.

Figura 1.3. La hidrólisis de la lactosa

La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. Por otra parte, la síntesis de la lactosa tiene lugar por influjo del sistema lactosintetasa, formado por dos enzimas: la alfalactoalbúmina y la uridindifosfogalactosil-transferasa (figura 1.4).

La lactosa sufre fácilmente fermentación ácida, láctica y butírica.



Alfa-D-galactopiranosil-beta-D-glucopiranososa

Figura 1.4. La síntesis de la lactosa.

Se encuentra formada por la unión β (1-4) de la β -D-galactopiranososa (galactosa) y la α -D-glucopiranososa (glucosa).

1.1.1.2. Usos de lactosa

La lactosa es un ingrediente muy importante en la industria farmacéutica y alimentaria y se utiliza bajo diversas formas.

1. En la industria **farmacéutica** se usa como diluyente de los principios activos, en la fabricación de comprimidos y cápsulas. Es prácticamente inerte y por lo tanto compatible con diversas sustancias farmacológicamente activas, convirtiendo a la lactosa en el excipiente ideal en muchas aplicaciones.
2. En la industria **alimentaria** se utiliza entre otras cosas, en la fabricación de alimentos para lactantes, ya que se hidroliza más fácilmente que la sacarosa. Es menos dulce y ayuda a restablecer la microflora intestinal, por proporcionar un medio adecuado a los lactobacilos. También se utiliza para la manufacturación de gran número de productos no lácteos (panes, cereales, bebidas, salsas, etc.)

1.1.1.3. Valor nutritivo de la lactosa

Los hidratos de carbono representan la principal fuente de energía para el organismo, alrededor del 50-60% de las calorías de la dieta diaria. El consumo de leche es muy importante, siendo el hombre el único mamífero que continúa ingiriendo tras el destete leche procedente de otros animales durante toda la vida, aunque no sea un alimento indispensable después del período de lactancia.

El aporte calórico de la lactosa es muy importante en la primera infancia, ya que durante este período los hidratos de carbono ingeridos representan 35-50% del total de calorías de la dieta y en esta fase inicial de la nutrición, el azúcar exclusivo es la lactosa, procedente de la leche de la madre o de las leches de fórmula adaptada (Leis-1992).

1.1.2. El enzima lactasa y su regulación

La lactasa o hidrolasa fluorizin lactasa es un enzima que se localiza en la superficie apical de la membrana en cepillo de los enterocitos, donde está anclada a la membrana por su extremo C-terminal y tiene la mayor parte de la molécula proyectándose hacia el intestino (Swallow-2003). Se trata de una glucoproteína grande con dos actividades enzimáticas: la actividad de lactasa (EC 3.2.1.108) y la actividad de fluorizin hidrolasa (EC 3.2.1.62) (Mackey-2002, Nemeth-2003, Troelsen-2005). La actividad de lactasa también hidroliza la celobiosa, la celotriosa, la celotetrosa y en cierto grado, la celulosa. La actividad de fluorizin hidrolasa se ha encontrado en todos los vertebrados, mientras que la actividad de lactasa ha sido detectada solamente en los mamíferos. Las dos actividades enzimáticas están localizadas en posiciones diferentes de la proteína, según lo indican tanto estudios enzimáticos (Arribas-2000) como estudios con proteínas de expresión recombinante, que apuntan hacia un modelo *two-site*, es decir, con dos sitios activos (Zecca-1998).

La lactasa está codificada por un solo gen (LCT) de aprox. 50 kb (Boll-1991), localizado en el cromosoma 2q21 y que está compuesto por 17 exones (Harvey-1993). El gen codifica una pre-proteína que contiene 1927 aminoácidos y consta de 5 dominios. Dos de ellos no aparecen en la proteína madura; un péptido señal de 19 aminoácidos y una porción de 849 aminoácidos. Tres de ellos corresponden a la proteína madura; una cadena polipeptídica con las actividades lactasa y fluorizin hidrolasa, un dominio hidrofóbico de anclaje a la membrana cerca del extremo C-terminal y un pequeño segmento citoplasmático en el extremo C-terminal. El gen tiene cuatro porciones homólogas, lo cual sugiere que evolucionó por dos ciclos de duplicación génica (Keller-1995, Mesonero-1998, Zecca-1999).

Hay pruebas de que la lactasa es O-glucosilada por serinas y treoninas, como también N-glucosilada por asparagina, y que esta glucosilación afecta probablemente la actividad enzimática y también el transporte intracelular (Swallow-2003).

La expresión de la lactasa, tanto en humanos como en animales, está regulada por un patrón espacial complejo y de desarrollo en el intestino delgado. Algunas de las características del patrón de la expresión de la lactasa se han elucidado en las últimas décadas utilizando modelos animales y de culturas de células intestinales.

Maiuri *et al.* mostraron que la expresión de la lactasa después del destete es fragmentaria en la parte distal del intestino delgado en los conejos. El mismo fenómeno se encontró en los individuos con hipolactasia de tipo adulto tanto en el nivel de las proteínas, como del ARNm (Maiuri-1991, Maiuri-1994) y en las partes proximal y distal del intestino delgado de las ratas después del destete (Rings-1994). Este hallazgo implica que la baja actividad de la lactasa observada después del destete, en estas partes del intestino delgado, no es un resultado de una desensibilización general de la expresión de la lactasa en todos los

enterocitos, sino de un bloqueo completo de la expresión de la lactasa en la mayoría de los enterocitos. Esta expresión fragmentaria del gen de la lactasa indica que la desensibilización de la expresión de la lactasa podría ser controlada por mecanismos epigenéticos.

Otra observación interesante es que el ARNm de la lactasa no está igualmente distribuido en los enterocitos (Rings-1992). El ARNm de la lactasa es concentrado en el citoplasma localizado por debajo de la membrana apical. Entonces, parece que haya una co-localización entre el ARNm de la lactasa y la proteína lactasa en la parte apical del enterocito. Sin embargo, el mecanismo y las consecuencias de la localización restringida del ARNm de la lactasa no están aclarados.

El gen de la lactasa tiene un patrón de regulación complejo tanto a nivel celular (la expresión dependiente de la diferenciación en los enterocitos), como a nivel de órgano (expresión diferencial específica para los tejidos a lo largo del eje longitudinal del intestino delgado) o durante el desarrollo (el declive post destete). Estudios *in vitro* sobre el promotor de la lactasa y los factores de transcripción que regulan la expresión de la lactasa, han identificado algunos de los mecanismos moleculares potenciales que controlan esta regulación.

Una región de 150 pb del promotor de la lactasa, justo corriente arriba del sitio de transcripción inicial está bien conservada en ratas, ratones, conejos, cerdos y humanos, indicando que en esta región, se localizan importantes elementos reguladores *cis*-. Análisis funcionales del promotor han revelado que esta parte proximal del promotor de la lactasa tiene una baja actividad en líneas de células intestinales y que no tienen actividad en los tipos de células no intestinales (Krasinski-2001, van Hering-2002a, van Hering-2002b, Mitchelmore-2000, Mitchelmore-1998, Troelsen, 1992, Troelsen-1994, Troelsen-1997, Fang-2000, Fang-2001, Verhave-2004, Spodsberg-1999).

La expresión de la lactasa es un marcador común utilizado para los enterocitos diferenciados. El enzima lactasa está limitado exclusivamente al intestino delgado de todos los mamíferos investigados (Büller-1990, Maiuri 1994). Sin embargo, durante el período post natal, puede detectarse una expresión menor del ARNm de la lactasa en el colon (Freund-1990, Wang-1994). Se ha observado en ratas y conejos adultos que la expresión de la lactasa era más alta en el yeyuno medio, con un nivel más bajo en el yeyuno proximal y en el duodeno. Desde el yeyuno medio, la actividad de la lactasa desciende gradualmente hasta el nivel más bajo en el yeyuno distal (Büller-1990, Rings-1994).

En los mamíferos, la leche es el nutriente principal consumido después de nacer. Como consecuencia, es esencial para los recién nacidos ser capaces de hidrolizar las grandes cantidades de lactosa encontradas en la leche. La alta expresión de la lactasa continúa hasta el período del destete, cuando los mamíferos cambian la ingesta de carbohidratos de la leche por una ingesta basada principalmente en las plantas y/o la carne. La expresión de la lactasa es

down-regulated (se va desensibilizando) durante el período de destete (el declive post destete), conduciendo después a niveles bajos de expresión de la lactasa (figura 1.5). Está generalmente aceptado que éste declive de la lactasa de los mamíferos es similar en los humanos. También se considera que tanto la *down-regulation* (desensibilización) del LPH en el hombre, como el período de declive post destete en los animales, están regulados principalmente a nivel transcripcional, como una correlación entre el nivel estable del ARNm de la lactasa y la actividad de la lactasa, que existe en la mayoría de los humanos (Wang-1995, Wang-1998, Escher-1992, Fajardo-1994, Rossi-1997) y de los animales (Büller-1990, Lacey-1994, Krasinski-1994), aunque hay algunos estudios que sugieren que podrían estar implicados mecanismos post-trasnccripcionales (Sebastio-1989, Freund-1990, Witte-1990).

El declive post destete de la lactasa se estudió extensamente en las ratas (Büller-1990, Freund-1990, Rings-1994, Krasinski-1994), en las cuales se puede detectar en el día 20 después de la gestación (Rings-1992). Después del nacimiento, la proteína de la lactasa está presente en todas las secciones del intestino delgado. Después del día 14, la expresión de la lactasa se pierde gradualmente desde la parte proximal hacia la parte distal del intestino delgado y en la rata con destete completamente finalizado, la lactasa está solamente presente en la sección media del intestino delgado. En el momento del destete, los enzimas necesarios para la digestión de los carbohidratos de las plantas, por ejemplo la sucrasa-isomaltasa y la maltasa, están sobresensibilizadas, *up-regulated* (regulación positiva), en los roedores. La regulación de la sucrasa-isomaltasa y la maltasa es diferente en los humanos, como estos enzimas están presentes antes del nacimiento y se conoce muy poco sobre la distribución horizontal de la lactasa en los humanos.

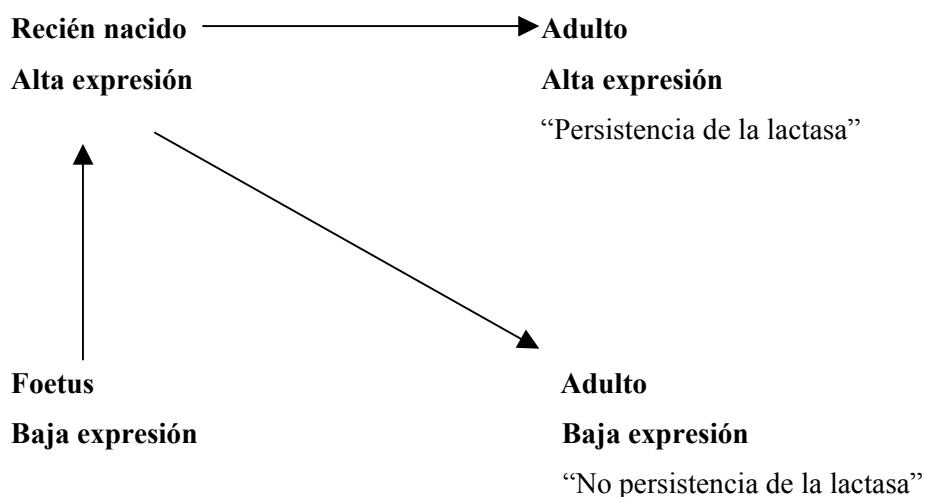


Figura 1.5. Representación diagramática del nivel de expresión de la lactasa en los diferentes estados de desarrollo y en los adultos persistentes y no persistentes a la lactasa. Los niveles de actividad de la lactasa se regulan a nivel de ARN.

1.1.3. Definición de la malabsorción a la lactosa y los tipos de hipolactasia

El **síndrome de malabsorción** agrupa todos aquellos procesos caracterizados por una disminución de la absorción de nutrientes desde la luz intestinal hasta el medio interno, ya sea por problemas de **maldigestión** o por **malabsorción** propiamente dicha.

La **maldigestión** significa que los nutrientes no son correctamente “preparados” o escindidos en sus constituyentes elementales y por tanto no pueden ser absorbidos. En este caso, la pared intestinal no padece ninguna alteración histológica, patológica ni funcional que impida la absorción, sin embargo, ésta no se produce. La maldigestión puede deberse a la ausencia o disminución de las enzimas necesarias para la digestión de los nutrientes.

La **malabsorción en sentido estricto** se refiere a la incapacidad del epitelio intestinal de absorber los nutrientes perfectamente digeridos y preparados para ello. En este caso, el trastorno radica en la propia mucosa intestinal, que pierde su capacidad absorptiva, por deterioro o degeneración producida por múltiples procesos patológicos que desestructuran la morfología y la histología del tapizado de los enterocitos (enfermedad celíaca, ciertos fármacos, enfermedades inflamatorias intestinales etc.). Aquí incluimos también la **malabsorción secundaria a la lactosa**.

La actividad de la lactasa es alta y vital durante la primera infancia, cuando la leche es la fuente principal de la nutrición. Sin embargo, en la mayoría de los mamíferos, la actividad de la lactasa desciende después de la fase de destete y este es el caso en la mayoría de los seres humanos, que tienen el rasgo de **no persistencia de la lactasa**. En otros humanos sanos, la actividad de la lactasa persiste a un nivel alto a lo largo de toda la vida y esta característica se conoce como **persistencia de la lactasa**.

Entonces, en la población humana adulta existen **dos fenotipos** relacionados con la habilidad de digerir la lactosa:

1. El fenotipo de no persistencia de la lactasa, que se caracteriza por una pérdida de la capacidad de digerir la lactosa antes del período adulto, resultando la **hipolactasia de tipo adulto**. Una baja actividad de la lactasa provoca a menudo síntomas como la diarrea, el dolor abdominal o la flatulencia, después del consumo de grandes cantidades de leche fresca o de otros productos lácteos. Esto ocurre porque la lactosa no es hidrolizada eficientemente en el intestino delgado y como consecuencia, llega al íleon distal y al colon, donde la lactosa es fermentada por las bacterias. Los productos de fermentación provocan los síntomas de **intolerancia a la lactosa**.

Hay dos tipos de **hipolactasia** (tabla 1.2):

- **primaria** (la alactasia congénita y la hipolactasia de tipo adulto)
- **secundaria** (hipolactasia adquirida)

Tabla1.2. La clasificación del déficit de lactasa

Tipo de déficit de lactasa	Patogenia
Congénito	La actividad enzimática ausente desde el nacimiento
Primario	La reducción de la actividad enzimática determinada genéticamente durante la infancia o la adolescencia
Secundario	La disminución de la actividad enzimática como respuesta a la afectación de la mucosa intestinal (giardia, rotavirus, sprue tropical, enfermedad celíaca, sobrecrecimiento bacteriano, enfermedad de Crohn, resección intestinal)

La alactasia congénita es la pérdida congénita completa de lactasa y es muy rara. El déficit congénito de la lactasa es más común en la población finlandesa aislada. El defecto genético subyacente se localizó en el cromosoma 2q21-22 y se debe a mutaciones en el gen LCT (Järvelä-1998).

La hipolactasia de tipo adulto es la pérdida heredada, después del destete y es la causa más común de deficiencia primaria de lactasa y, por consiguiente, es importante de identificar clínicamente (Flatz-1987, Sahi-1994, Swallow-2003, Cook-1966).

La hipolactasia adquirida o secundaria es el daño intestinal secundario, por ejemplo, después de infecciones por rota virus o Giardia, o después de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los daños de la mucosa intestinal, así como ocurre con las infecciones gastrointestinales (por ejemplo la enteritis viral), el síndrome del intestino irritable, las enfermedades inflamatorias intestinales (por ejemplo la enfermedad de Crohn), la isquemia hipóxica, la radiación o la quimioterapia, pueden provocar la destrucción y la pérdida total del número de enterocitos, llevando a la deficiencia secundaria de lactasa y a otras deficiencias de hidrolasas digestivas (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Las causas de la hipolactasia de tipo secundario

1. Enfermedades del intestino delgado

- Enteropatía por HIV
- Enteritis regional
- Sprue (celíaco y tropical)
- Enfermedad de Whipple (lipodistrofia intestinal)
- Gastroenteritis severa

2. Enfermedades multisistémicas

- Síndrome carcinoide
- Fibrosis quística
- Síndrome Zollinger-Ellison
- Gastropatía diabética
- Kwashiorkor

3. Causas iatrogénicas

- Quimioterapia
 - Inducida por la colchicina en los pacientes con fiebre mediterránea
 - Enteritis por radiación
-

2. El fenotipo de persistencia de la lactasa de incidencia mucho menor, se caracteriza por la capacidad mantenida durante la vida adulta de expresar el enzima, y por tanto, de digerir la lactosa (Saavedra-1989, Flatz-1987). La hipolactasia de tipo adulto se hereda de forma autosómica recesiva (Sahi-1973), y aunque tradicionalmente se ha asumido que la expresión de la lactasa es influenciada por la ingesta de la lactosa, no hay pruebas que lo demuestren (Keusch-1969). En estos adultos con persistencia de la lactasa, evitar durante largo tiempo la lactosa no produce intolerancia a la misma; el rasgo es innato, representando una adaptación genética.

Es digno de mencionar que el término utilizado inicialmente para describir la condición de enfermedad, “**malabsorción a la lactosa**”, refleja un sesgo **eurocéntrico**: el estado de tolerancia encontrado en Europa o en gente de descendencia europea, se consideró por defecto como el “tipo salvaje”, con el que se contrastó el fenotipo de otras poblaciones. En realidad, el estado de malabsorción era el “tipo salvaje” o el estado ancestral y fueron los europeos los “mutantes” o los derivados.

Dado que se utilizan muchos términos sinónimos en la bibliografía de especialidad para describir la disminución de la actividad lactásica, nos parece importante reseñarlos aquí:

- **Deficiencia de lactasa = Déficit de lactasa**

Se refiere a un nivel de actividad del enzima en el borde en cepillo, por debajo del normal.

- **Deficiencia congénita de lactasa = Déficit congénito de lactasa**

Es un fenómeno muy poco frecuente, un defecto enzimático congénito, que se caracteriza por una actividad extremadamente baja al nacimiento (Saavedra-1989, Sahi-1978).

- **Deficiencia secundaria de lactasa = Hipolactasia secundaria**

Hace referencia a una actividad lactásica baja en los niños o adultos lactasa-persistentes, debida fundamentalmente a una lesión en la mucosa del intestino delgado. También se conoce como **hipolactasia secundaria** (Saavedra-1989, Sahi-1978).

- **No persistencia de la lactasa**

Describe el normal descenso de la actividad de este enzima durante el desarrollo, después de la edad del destete en la mayoría de los mamíferos y en los humanos.

- **Malabsorción a la lactosa**

Describe la disminución de la hidrólisis de lactosa a nivel intestinal, que suele ser debida, aunque no siempre, a una actividad baja del enzima lactasa (Saavedra-1989).

- **Intolerancia a la lactosa**

Este término hace referencia a la presencia de signos y síntomas clínicos después de la ingesta del azúcar. El término de “**intolerancia**” no es sinónimo de “**hipolactasia**”, ya que se puede hidrolizar la lactosa y referir síntomas después de su ingesta (Arola-1988).

En la literatura se encuentran múltiples denominaciones de este fenómeno, así Sahi (Sahi-1978) lo llamó **hipolactasia selectiva de tipo adulto**, para referirse a la baja actividad de la lactasa en la mucosa del intestino delgado, sin alteraciones de las otras disacaridasas, mientras que Flatz (Flatz-1987) sugiere el uso del término **restricción de lactasa**, para indicar la baja capacidad de digerir el azúcar. Son por tanto sinónimos (Saavedra-1989):

- **Deficiencia de lactasa de tipo adulto**
- **Hipolactasia primaria del adulto**
- **Deficiencia ontogénica de lactasa del adulto**
- **Deficiencia de lactasa racial y étnica**

1.2. DÉFICIT DE LACTASA DE TIPO ADULTO

1.2.1. Prevalencia

La actividad de la lactasa es alta y vital durante la primera infancia, cuando la leche es la fuente principal de la nutrición. Sin embargo, en la mayoría de los mamíferos, la actividad de la lactasa desciende después de la fase de destete y este es el caso en la mayoría de los seres humanos, que presentan el rasgo de **no persistencia de la lactasa**. En otros humanos sanos, la actividad de la lactasa persiste a un nivel alto a lo largo de toda la vida y esta característica se conoce como **persistencia de la lactasa**. La distribución de estos fenotipos diferentes de lactasa en las poblaciones humanas es altamente variable, observación que durante mucho tiempo fue una fuente de interés para la genética evolucionista (Swallow-2003).

Todos los humanos, excepto los norte europeos blancos y algunos grupos étnicos (por ejemplo, los tribus de Beduinos y de africanos que se ocupan con la producción de lácteos) son hipolactásicos, es decir que tienen un nivel muy bajo de lactasa. Esto ocurre porque pierden 75%-90% del enzima en unos cuantos años después del destete (Cuatrecasas-1965, Cook-1966, Kretchmer-1971, Flatz-1987, Sahi-1994, Swallow-2003, Olds-2003).

1. La distribución geográfica de la **persistencia de la lactasa** es altamente no uniforme (figura 1.6): es muy prevalente (>70% de la frecuencia de la población) en los norte europeos (Alemania, Austria, Suiza, Norte de Francia, Holanda, Inglaterra, Irlanda, Península Escandinava y también en las poblaciones nómadas de las zonas áridas del norte y del centro de África y Arabia (los Tuareg, Fulbé, Beja y Bedouin) (Troelsen-2005). Tiene una frecuencia intermedia (30-70%) en el Oriente Medio, alrededor del Mediterráneo, en el sur y el centro de Asia y una frecuencia baja en los americanos nativos y en las islas del Pacífico, como también en el África sub-sahariana y en el sur-este asiático. Es decir, el fenotipo parece ser más frecuente en las poblaciones con historia de consumo de leche fresca y menos frecuente en las poblaciones sin esta historia. Por esto, la persistencia de la lactasa fue considerada durante mucho tiempo como una probable adaptación a los cambios dietéticos introducidos por el desarrollo de la agricultura y la domesticación de los animales en el Oriente Próximo (Jobling-2004). La persistencia de la lactasa está presente en el norte europeo, con frecuencias máximas en Suecia y Dinamarca, observándose un declive a medida que nos mudamos hacia el sur y el oeste. Un declive similar se ve desde el norte hacia el sur de India (Swallow-2000). En general, la frecuencia es baja en el resto del mundo, incluyendo las poblaciones asiáticas. Sin embargo, la persistencia de la lactasa es frecuente en los nómadas dependientes de la leche de la zona desértica afro-arábica. En estas regiones, los pastores tienen frecuencias más altas de persistencia de la lactasa que sus vecinos que no son pastores.

2. La **no persistencia de la lactasa** es el fenotipo predominante en la población nativa de Australia, América, en el Pacífico, en el Este y Sureste de Asia y en África tropical (Swallow-2000). En EEUU, aproximadamente 15% de los caucásicos, 50% de los mexicanos y más del 80% de los afro-americanos presentan **intolerancia a la lactosa** (Vesa-2000). La condición (enfermedad) es más prevalente en los países de África y Asia, con una frecuencia de 80-100%, mientras que en los países del norte-europeo la prevalencia de la hipolactasia de tipo adulto varía entre 1-18% (Semenza-2001). Algunos grupos, en los cuales la no persistencia de la lactasa es el fenotipo más frecuente, incluyen la leche como parte de su dieta, como por ejemplo los Mongoles, Herero, Nuer (Swallow-2000) y los Dinka. Varios grupos como los Dinka utilizan las vacas como un símbolo y no como una fuente significativa de nutrición. La leche es fermentada a menudo para hacer productos como el yogur y el queso, que tienen un contenido mucho más bajo en lactosa. No obstante, esta correlación entre la cultura y los rasgos genéticos conduce a la idea de que el alelo de persistencia de la lactasa alcanzó a su alta frecuencia como resultado de una alta selección en la población pastoral que desarrolló la cultura de la leche en el período Neolítico.

La frecuencia de la malabsorción tiene un rango entre 2% en la Península Escandinava y 20-25% en la población caucásica de Europa y Estados Unidos, hasta 80% en los afro-americanos y casi 100% en las poblaciones del sur-este asiático (Swallow-2003). En la tabla 1.4 se observa la prevalencia de la hipolactasia en unas poblaciones seleccionadas por Sahi (1994).

Tabla 1.4. La prevalencia de la hipolactasia en poblaciones seleccionadas (Sahi, 1994)

Población	Hipolactasia (%)
Norte europeos	2 a 15
Daneses	3-6
Finlandeses	6-19
Central europeos	9 a 23
Blancos americanos	6 a 22
Indianos (Subcontinente indiano)	
Norte	20 a 30
Sur	60 a 70
Indios americanos	62-100
Mejicanos	66-74
Esquimales (Canadá)	82
Negros de EEUU	70-80
Nigerianos	
Yoruba	90-99
Fulani	22
Aborígenes (Nueva Guinea)	77-86
Judíos Ashkenazi	60 a 80
Chinos (Han)	86-92
Thai	97-100

Con respecto a los trabajos realizados en España sobre la incidencia de la malabsorción de la lactosa, el primero fue Peña y col. que estimaron en adultos, mediante el test de tolerancia de la lactosa, una incidencia de 18,8%. En 1975, Vázquez *et al.* realizaron un estudio multicéntrico en 715 personas de todas las edades, procedentes de Madrid, Andalucía, Extremadura, País Vasco y Galicia y utilizando, al igual que Peña, el test de tolerancia de lactosa, encontraron una incidencia en la edad adulta de 14,8%. Tormo e Infante (1987) llevaron a cabo el primer trabajo utilizando el test de hidrógeno espirado, en 32 niños de 4 a 11 años, con una sobrecarga de lactosa de 2 g/kg peso y encontraron un test superior a 20 ppm de H₂ espirado en 46,9% de ellos. En 1990, Escribano Jubías publica una incidencia estimada en la población de Cinca Medio con la sobrecarga de lactosa, de 30,2%. R. Leis Trabazo publica en 1992, con el motivo de su tesis doctoral, sobre la “incidencia de las alteraciones del metabolismo de la lactosa en la población de Galicia”, una incidencia de 38,4%, estimada en 850 personas de la población general.

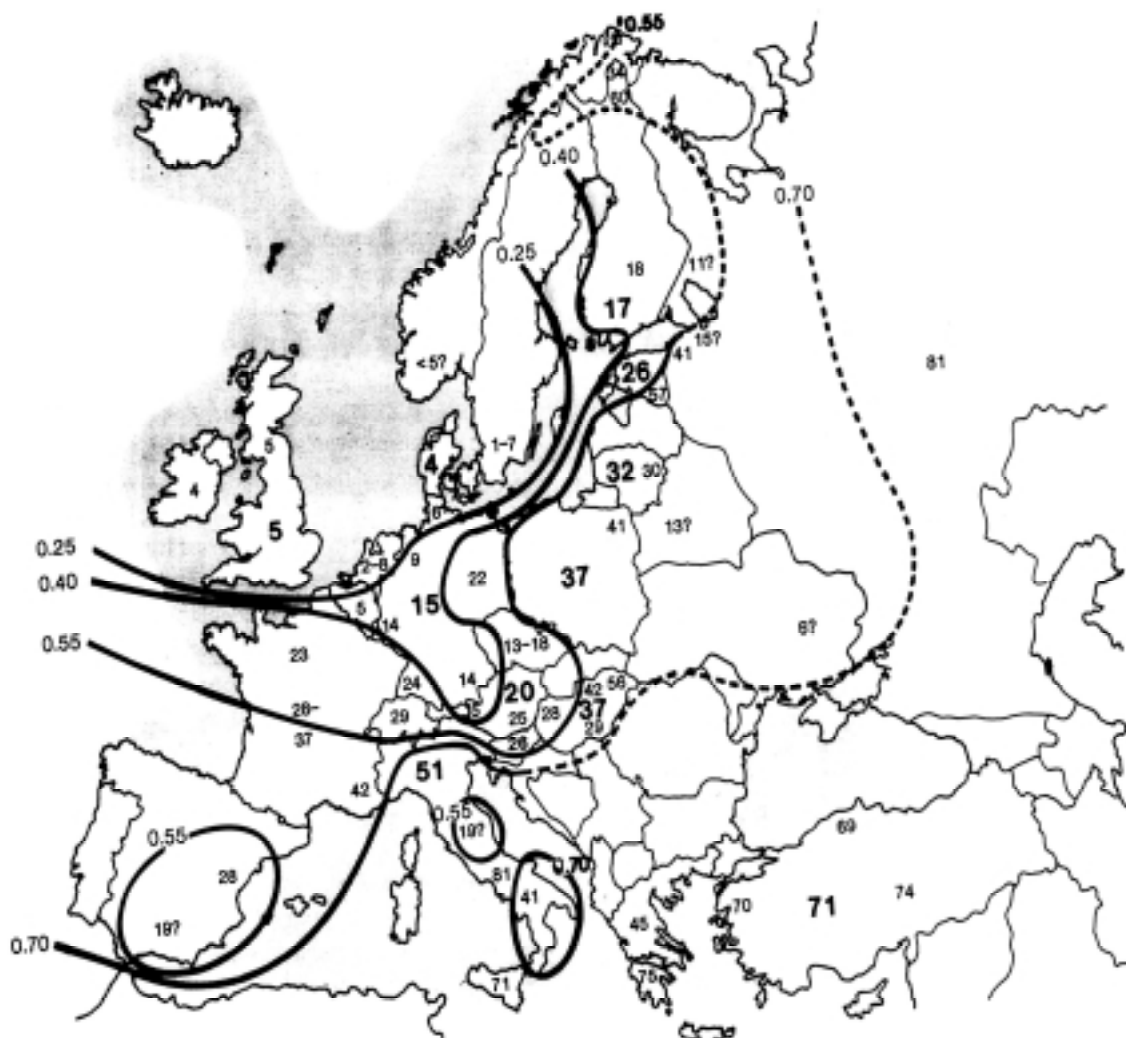


Fig. 1.6. La prevalencia de la hipolactasia de tipo adulto en diferentes países y poblaciones europeas (el número pequeño significa la prevalencia de una población y el número grande la prevalencia de un país) y los isogramas hipotéticos de las frecuencias del gen de no persistencia de la lactasa. (Sahi 1974).

1.2.2. Edad de aparición de la hipolactasia de tipo adulto

La hipolactasia de tipo adulto se hereda como un rasgo autosómico recesivo, conduciendo a la reducción de la actividad de la lactasa en la mucosa intestinal. Es el déficit enzimático más común en los seres humanos, con una edad de aparición en el rango de 1-20 años en poblaciones de diferentes etnias. El nivel final y el curso en el tiempo de la pérdida de la lactasa varían considerablemente con el grupo étnico (Flatz-1987, Sahi-1994, Swallow-2003). El mecanismo que está detrás de las diferencias étnicas en la cronología del declive de la expresión de la lactasa no se conoce en el presente.

En negros y en asiáticos, la hipolactasia se manifiesta de costumbre en la infancia temprana, mientras que en blancos aparece más tarde en la infancia o en la adolescencia (Scrimshaw-1988). Aunque la intolerancia a la lactosa no es común en los niños pequeños blancos, las infecciones con el rota virus podrían ser una causa importante de malabsorción a la lactosa en los niños y después de que la infección este curada, la malabsorción a la lactosa desaparece también.

La relación de la malabsorción a la lactosa con la raza y la etnia se ha estudiado en algunas poblaciones. Se había descrito que la expresión de la lactasa en los Thais y en los chinos es suprimida temprano en la vida (aprox. a los 2 años) (Keusch-1969), mientras que los individuos finlandeses se vuelven hipolactásicos en la adolescencia (Sahi-1983). Los chinos y los japoneses pierden entre 80%-90% en los primeros 3-4 años después del destete, mientras que los asiáticos y los judíos pueden retener un 20%-30% de la actividad, para llegar al nivel más bajo tras varios años. Un 10% de los blancos norte europeos que pierden la lactosa después del destete, pueden pasar 18-20 años hasta llegar al nivel más bajo de lactasa. En definitiva, la mayoría de la población del mundo (aproximadamente 6000 millones) son hipolactásicos (Matthews-2005). Un estudio reciente demostró que el declive de la actividad de la lactasa aparece temprano en los niños africanos comparados con los niños finlandeses (Rasinpera-2004). Una investigación completa de la expresión de la lactasa en 866 niños en una población mixta del Reino Unido demostró que la reducción de la lactasa se podría detectar empezando el segundo año de vida, pero que es variable (Wang-1998).

En los Pima Indians, se encontró un 40% de malabsorción entre los 3 y 4 años y el 100% en mayores de 8 años. Por lo tanto, en este grupo étnico, no sólo es mayor la deficiencia del déficit enzimático, sino que su expresividad es mucho más temprana que en nuestra región. Lo mismo ocurre en los niños nigerianos, donde el 79% ya es malabsorbente después del destete, cifra muy similar a la del adulto. En Singapur, la intolerancia se hace más frecuente a partir de los 4 años y se encuentra en todos los niños mayores de 10 años. En uruguayos, Maggi (1987) encontró que el 25% de los niños de 0 a 4 años eran malabsorbentes y tolerantes y el 75% de 10 a 14 años eran malabsorbentes (de los cuales 40% intolerantes). En Finlandia, donde

la incidencia del déficit de la lactasa es muy baja, Sahi e Isokoski (1972) realizaron un estudio sobre 129 niños de 7 a 15 años, con el fin de establecer la edad de presentación, después de administrar lactosa 1 g/kg peso, con un test de tolerancia a la lactosa, concluyendo que la deficiencia podría empezar antes de los 7 años, pero que se desarrollaba más frecuente entre los 10 y 20 años. En Grecia, donde la prevalencia del déficit enzimático era del 75% de los adultos, Ladas (1991) concluyó que aunque el descenso de la actividad de la lactasa intestinal comience antes de los 5 años en la mayoría de los niños griegos, una verdadera malabsorción e intolerancia a la lactosa después de un vaso de leche es raramente visto a esta edad.

Por otra parte, en nuestro medio, R. Leis encontró en Galicia una incidencia de la malabsorción de 37,2% en el grupo de 6-10 años. La incidencia hallada por Escribano en 27 niños de 4-14 años de la Comarca de Cinca Medio fue de 18,5%, siendo mucho más baja que la nuestra. Al contrario, Tormo encontró en 32 niños de 4 a 11 años una incidencia de 46,9%.

Hay algunas pruebas que demuestran que la actividad lactásica intestinal no continua su declive con la edad, porque no se observaron diferencias entre la prevalencia de la hipolactasia entre los adultos más jóvenes o más mayores. Sin embargo, la prevalencia de la hipolactasia es más común en los adultos que en los niños (Caskey-1977, Welsh-1978).

Los resultados sobre la aparición de los síntomas en función de la edad son contradictorios. Jussila *et al.* (Jussila-1969b) encontró que la edad media de los malabsorbentes a la lactosa sintomáticos era más alta (46 años) que aquella de los malabsorbentes no sintomáticos (31 años), mientras que Suárez y Savaiano (Suárez-1994) no encontraron ninguna diferencia en los síntomas entre el grupo de edad de mayores de 65 años y el grupo con edades entre 20 y 40 años. De todas formas, el número de sujetos estudiado hasta ahora es muy pequeño para que permita sacar conclusiones definitivas sobre el efecto de la edad en experimentar los síntomas.

Puede haber diferencias en la producción de hidrógeno, después de la ingesta de lactosa, en función de la edad, pero los hallazgos no son completamente consistentes. Se demostró que la cantidad de hidrógeno espirado aumenta con la edad, después de la edad de 64 hasta los 70 años (Caskey-1977, Rao-1994). Lo mismo se vio comparando un grupo de sujetos mayores, cuya edad media era de 76 años, con un grupo de adultos más jóvenes, con la edad media de 32 años, después de la sobrecarga con lactulosa en (Saltzberg-1988). Sin embargo, en el estudio de Rao *et al.* (Rao-1994), la excreción de hidrógeno fue más baja en el grupo de edad de mayores de 70 años que en un grupo con edades entre 60 y 69 años. No se conoce si estas variaciones se deben a diferencias en la digestión de la lactosa en la microflora colónica.

1.2.3. La relación entre la hipolactasia de tipo adulto y el sexo

En poblaciones seleccionadas al azar, el sexo no tuvo ningún efecto sobre la prevalencia de la hipolactasia (Rao-1994, Sahi-1974). Hay pocos estudios que comparan la tolerancia a la lactosa entre los sexos. Jussila (Jussila-1969a) encontró que en 504 pacientes hospitalizados, las mujeres presentaron más síntomas gastrointestinales que los hombres, después de la ingesta de leche. Krause *et al.* (Krause-1996) encontró que las mujeres obtuvieron una puntuación más alta en el número de síntomas que los hombres, a pesar de su excreción más baja de hidrógeno. Estos hallazgos, sobre las diferencias en la excreción de hidrógeno entre los dos sexos, no coinciden con los resultados de Saltzberg *et al.* (Saltzberg-1988), que no encontró ninguna diferencia entre los hombres y las mujeres, después de la ingesta de lactulosa. Considerando los resultados de los estudios mencionados anteriormente, se observa que las mujeres experimentan más síntomas gastrointestinales que los hombres, pero no es posible sacar ninguna conclusión sobre las diferencias en la producción de hidrógeno basada en el género.

1.2.4. Consideraciones genéticas de la hipolactasia de tipo adulto

En el año 1966 se sugirió por primera vez que la intolerancia a la lactosa se debía a un polimorfismo genético (Bayless y Rosensweig-1966).

Estudios con sujetos de todo el mundo confirmaron que la deficiencia de lactasa de tipo adulto era una característica racial y los estudios en familias mostraron que era un carácter genético que se transmitía de forma autosómica recesiva (Sahi-1974).

Otras pruebas de la naturaleza genética de esta variación provienen de un estudio de digestión de la lactosa realizado en gemelos. La concordancia de los fenotipos de tolerancia a la lactosa fue completa en los gemelos monozigóticos y la distribución de las parejas de gemelos dizigóticos corresponde con la distribución de Hardy-Weinberg (Metneki-1984).

En el año 1982, Ho *et al.* estudiaron distintos fenotipos de actividad de la sucrasa y lactasa en muestras de biopsias de pacientes fallecidos accidentalmente o por otras causas de muerte súbita y encontraron una distribución trimodal de las actividades enzimáticas, por lo que concluyeron que esta se debía a diferentes niveles de actividad de la lactasa en tres genotipos (homocigoto persistente, heterocigoto y homocigoto no persistente). Es decir, que habría un determinado alelo de persistencia y otro de no persistencia, producidos por polimorfismos genéticos. La estimación de la frecuencia alélica para el alelo persistente fue de 0,747.

Más adelante, Flatz *et al.* (1987), concluyó que la intolerancia a la lactosa se transmitía como un rasgo recesivo, mientras que la persistencia de la lactasa se comportaba como una característica dominante, porque la mitad de los niveles de la lactasa son suficientes para mostrar una digestión significativa de la lactosa. Sin embargo, en condiciones de estrés o de patología relacionada con la leche, los heterocigotos podrían estar más predispuestos a convertirse en intolerantes a la lactosa que los homocigotos (Weiss-1998).

El gen de la lactasa (LCT) se consideró un gen candidato evidente para la hipolactasia (Kruse-1988), por lo que Wang *et al.* (1995) se propusieron investigar si esas supuestas variantes genéticas (C/T-13910 y G/A-22018) se encontraban “dentro de” o “adyacentes” al mismo. Es decir, si estas actuaban en *cis*- o bien si se debían a factores *trans*- activadores, por lo que estudiaron polimorfismos intra-génicos y vieron que había una correlación con los niveles de expresión del gen, lo que significa que el polimorfismo responsable de persistencia/no persistencia se encontraba en *cis*-. Este hallazgo reducía mucho el área del genoma que se debía de estudiar para hallar secuencias relevantes.

También Harvey (1995) encontró siete polimorfismos en el gen de la lactasa altamente asociados con la persistencia de la lactasa y que daban lugar a 3 haplotipos comunes llamados A, B y C en los individuos europeos, siendo el haplotipo A el relacionado con la persistencia de la lactasa y el más común en el norte de Europa (Hollox-2002).

Uno de los estudios más importantes en el desarrollo del conocimiento genético sobre la hipolactasia de tipo adulto, pertenece a un equipo de investigadores finlandeses: Enattah *et al.* (2002). Ellos realizaron estudios de ligamiento utilizando varios marcadores microsatélites localizados en la vecindad del gen LCT en familias finlandesas. Los análisis de los marcadores microsatélites sugirieron que esta región contenía una mutación causativa. Utilizando el desequilibrio de ligamiento y el análisis del haplotipo de los marcadores estrechamente ligados, la región más probable fue localizada en el exterior del gen LCT. Este equipo encontró una asociación completa entre la no persistencia de la lactasa, verificada bioquímicamente en unas familias finlandesas y los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018, situados a 14 kb y 22 kb, respectivamente, corriente arriba del locus del gen de la lactasa, siendo los alelos C y G, respectivamente, los que se asociaban con la hipolactasia. En el 90% de los casos, estas dos variantes segregaban con la hipolactasia, mostrando un desequilibrio de ligamiento casi completo. Sin embargo, la variante G/A-22018 no segregaba con la hipolactasia en el 10% de los casos, lo que sugiere que ésta está solamente en desequilibrio de ligamiento con la variante *T-13910, pero que no es causativa, lo cual se pudo confirmar más adelante. La presencia de la variante *T-13910 en 1047 muestras de ADN fue coherente con la prevalencia comunicada de hipolactasia de tipo adulto en 4 poblaciones diferentes. Todos los individuos con deficiencia de la lactasa de tipo adulto fueron homocigotos para el alelo C (Enattah-2002).

Los hallazgos de esta asociación en poblaciones diferentes y lejanas, sugerían que la persistencia de la lactasa es antigua y que apareció antes de la diferenciación de estas poblaciones.

La conclusión es compatible con la hipótesis de que la persistencia de la lactasa de tipo adulto se volvió más prevalente después de la introducción de la cultura basada en productos lácteos, aproximadamente 10000-8000 antes de Cristo (Holden y Mace-1997). Un poder de selección de 3 a 5% sería suficiente para explicar la presencia frecuente de la persistencia del alelo de la lactasa en el norte de Europa.

Otros autores trataron de encontrar pruebas basadas en la genética poblacional, que demostraran que la selección podría ser un posible factor en la alta frecuencia de la persistencia de la actividad de la lactasa en las poblaciones europeas (Bersaglieri-2004). Ellos estudiaron 101 *SNPs* (single-nucleotide polymorphism) que cubrían 3,2 Mb alrededor del gen de la lactasa y encontraron que los 2 alelos ya descritos por Enattah et col. (C/T-13910 y G/A-22018) se asocian fuertemente con la persistencia de la lactasa en las poblaciones norte-europeas y que marcan un haplotipo común (aproximadamente 77%) que se extiende sin interrupciones a lo largo de 1 Mb. y demostraron que este haplotipo se generó por selección reciente. Los autores citados estiman que esta selección ocurrió hace 5000-10000 años, lo cual es compatible con el establecimiento de la agricultura productora de lácteos. Casualmente, estas dos variantes están

localizadas en los intrones 13 y 9 del gen MCM6, que es un miembro de la familia de genes (MCM 2-7), necesario para la iniciación de la replicación del ADN.

En cuanto al efecto de los polimorfismos genéticos sobre el patrón de reducción de la expresión de la lactasa con la edad, se sugirió que estarían regulando la expresión génica, por primera vez en el año 1991 (Montgomery-1991).

Del mismo modo, en estudios realizados con biopsias de intestino delgado de pacientes de etnias diferentes, se comprobó que los niveles altos ARNm se correlacionaban siempre con niveles elevados de la actividad de la lactasa (Escher-1992).

A partir del descubrimiento de la fuerte asociación de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 corriente arriba del LCT, se estudió *in vitro* su posible papel funcional en la regulación de la transcripción del gen (Olds-2003, Troelsen-2003), mediante transfecciones con constructos de las dos variantes en células intestinales humanas Caco-2. Se demostró que el alelo *T-13910, asociado con la persistencia de la lactasa, activaba la transcripción del gen en mayor medida que el alelo *C-13910, asociado con la no persistencia de la lactasa. Además, se demostró una fuerte interacción entre el alelo T y un factor nuclear de las células Caco-2, mientras que la interacción del alelo C era débil, lo que sugiere que la diferencia de la expresión del gen LCT en los dos alelos se debe a la unión diferencial de ese factor nuclear. Se examinó también el otro polimorfismo G/A-22018, que mostraba asociación con la hipolactasia, aunque no del 100%, para evaluar su actividad reguladora. Ni el alelo *A-22018, ni tampoco el alelo *G-22018 muestran una actividad reguladora génica significativa. Por otra parte, en estudios de biopsias intestinales humanas, se comprobó que los niveles de ARNm en la mucosa intestinal, en los individuos con el alelo *T-13910, eran mayores que los encontrados en los individuos con el alelo *C-13910, confirmando los resultados obtenidos *in vitro* (Kuokkanen-2002).

Por otra parte, también se han identificado numerosos factores de transcripción que se unen a la región promotora del gen LCT, pero su papel como moduladores genéticos de la persistencia/ no persistencia de la lactasa no está aclarado (Mitchellmore-1998, Mitchellmore-2000, Fang-2001, Krasinski-2001, van Wering-2002a).

En los niños pequeños no se han descrito diferencias en las actividades de la lactasa ni diferencias en la expresión alélica de los genes de la lactasa (Wang-1998). Esto indica que los polimorfismos asociados con la persistencia o la no persistencia de la lactasa no influyen en la expresión de la lactasa durante el período de amamantamiento, sino solamente después.

1.2.5. Teoría evolucionista del déficit de lactasa de tipo adulto

La **hipótesis de la adaptación** hace la razonable suposición (dada la ausencia de la persistencia de la lactasa en otros mamíferos) de que la no persistencia de la lactasa es nuestro estado ancestral (Jobling-2004). Para explicar el estado no natural, la persistencia de la lactasa, han sido propuestas varias explicaciones, la mayoría basadas en mecanismos evolutivos que fueron capaces de originar un aumento de la frecuencia de alelos persistentes en las poblaciones que consumen productos lácteos (Hollox y Swallow-2002):

1-El contenido en agua: la leche representa un importante fluido adicional, en particular en las zonas áridas. Para algunos nómadas del desierto, la leche puede ser la única fuente de agua en algunos periodos del año y la diarrea como consecuencia de la intolerancia a la lactosa, sería una desventaja muy seria.

2-La absorción aumentada de calcio: esta hipótesis (desarrollada por Flatz y Rotthauwe-1973) intenta explicar la alta frecuencia del fenotipo en el norte de Europa, aunque allí la agricultura mixta implica una menor importancia de la leche. Las poblaciones de latitudes nórdicas serían más susceptibles al raquitismo y a la osteomalacia, debido a la poca luz solar y al nivel de vitamina D consecuentemente bajo. La lactosa promueve la absorción del calcio de la leche y aquel reduce las pérdidas de vitamina D y previene el raquitismo (Thacher-1999), por lo que éste debería ser menos frecuente en individuos con persistencia de la lactasa.

3-La protección en contra de la malaria: esta hipótesis, no mayoritaria, se basa en la observación de que los individuos que tienen deficiencia moderada de flavina, son protegidos de alguna forma en contra de la malaria provocada por *Plasmodium falciparum*. La leche es rica en riboflavina, así que la gente que no la puede consumir podría ser menos susceptible a la malaria. La no persistencia de la lactasa es más prevalente que la persistencia en las regiones con malaria.

Todas estas hipótesis parecen ser explicaciones plausibles para la distribución de la persistencia de la lactasa. Es digno de mencionar que algunos investigadores consideran que, la ingesta de la leche fresca en grandes cantidades es una innovación tan reciente, que no se puede invocar un mecanismo de selección, sino más bien un cambio genético. No obstante, la distribución fragmentaria de este carácter en África y su aparente asociación con el pastoreo es una hipótesis convincente. Para analizar la plausibilidad de las diferentes hipótesis es útil analizar la correlación entre el pastoreo, la aridez y la cantidad de luz solar, por un lado y la persistencia de la lactasa, por otro. Esta aproximación, sin embargo, ignora la co-ancestralidad de la población (Jobling-2004), por lo que ha habido que recurrir a un planteamiento **filogenético** (Holden y Mace-1997), utilizando tanto la **filogenia genética** (basada en los datos clásicos de frecuencia génica de Cavalli-Sforza), como la **filogenia cultural** (basada en la clasificación lingüística de Ruhlen).

En el marco de estas filogenias, se preguntó ¿cuál de estas tres variables (pastoreo, aridez y cantidad de luz solar) explica la mayor variabilidad en la persistencia de los niveles de lactasa? La respuesta fue la práctica del **pastoreo**, basándose en la hipótesis de que este rasgo es una adaptación al consumo de lácteos, pero no las otras hipótesis. Además, un planteamiento de máxima probabilidad de las posibles modalidades de cambio entre las cuatro posibles combinaciones de persistencia/no persistencia de la lactasa y la vaquería/no vaquería, indican que la vaquería apareció antes que la persistencia de la lactasa. Esta conexión entre el rasgo genético de la persistencia de la lactasa y el rasgo cultural de producción de leche es un excelente ejemplo de **co-evolución genético-cultural** (Feldman y Cavalli-Sforza-1989).

La teoría de la co-evolución genética-cultural se puede aplicar a la cuestión de si las presiones de selección que siguen a la adopción de la vaquería y del consumo de lácteos conducen a la difusión de la persistencia de la lactasa (Feldman y Cavalli-Sforza-1989). Este análisis muestra que el alelo persistente aumentó a altas frecuencias durante aprox. 300 generaciones (el intervalo entre el origen de la vaquería y el presente) solamente cuando hubo una fuerte transmisión cultural vertical del consumo de leche. Si una proporción significativa de los herederos de los consumidores de leche no hubieran consumido ellos mismos la leche, se hubiera necesitado una ventaja selectiva demasiado alta y no real para el consumo de leche, para que aparezca el alelo. La implicación de este hecho es que las diferencias interculturales en la fuerza de la transmisión podrían haber tenido un gran efecto en la distribución corriente del rasgo de persistencia. En este ejemplo, el gran efecto de la cultura implica que los predictores de modelos genéticos tradicionales podrían haber llegado a una respuesta equivocada (Jobling-2004).

La no persistencia de la lactasa es el estado ancestral y la persistencia de la lactasa devino provechosa con la invención de la agricultura, cuando la leche de los animales domesticados estuvo disponible para el consumo de los adultos. Tal como se esperaba, la persistencia de la lactasa se correlaciona fuertemente con la historia de consumo de productos lácteos en la historia de la humanidad. Así como mencionamos anteriormente, esta habilidad genética de digerir la leche fue vista como un ejemplo clásico de co-evolución genético-cultural, en la cual la cultura de la lechería creó una fuerte ventaja selectiva para aquellos que pudieron tomar la leche como adultos, porque solamente ellos pudieron beneficiarse de la leche (Hollox-2005).

El trabajo de Beja-Pereira (2003) confirmó esta conexión, analizando la diversidad en los genes de la proteína de leche bovina y mostrando que la mayor diversidad genética se encontró en vacas de áreas del mundo donde se practica la agricultura de los productos lácteos y la gente es tolerante a la lactosa (Beja-Pereira-2003). La leche de las vacas domésticas fue una fuente valiosa de alimentos desde hace más de 8000 años, especialmente en las sociedades humanas tolerantes a la lactosa que explotaron los productos lácteos (Beja-Pereira-2003).

Cuando se estudian los patrones geográficos de variación en los genes que codifican 6 de las más importantes proteínas de la leche en 70 granjas de ganado de origen europeo, se encuentra una coincidencia geográfica sustancial entre la alta diversidad de genes para la leche de ganado, la localización de los sitios donde estaban las granjas de ganado en la Europa neolítica (hace 5000 años) y la tolerancia a la lactosa en los europeos de hoy. Todo sugiere una co-evolución genético-cultural entre el ganado y los humanos (Beja-Pereira-2003). Algunas, pero no todas las poblaciones humanas, tienen la habilidad genéticamente determinada de digerir la lactosa de la leche en el período adulto de la vida, aprovechando la rica fuente nutritiva de la leche de vaca. Estas sociedades (del Norte de Europa) son tolerantes a la lactosa y altamente dependientes de los productos de la leche.

La tolerancia a la lactosa es un ejemplo de cambio evolutivo, basado en la selección, en los humanos que pertenecen a las culturas consumidoras de leche. Beja-Pereira buscaron respuestas a la pregunta siguiente ¿habrá tenido lugar también un cambio evolutivo detectable en los genes del ganado doméstico que pertenecían a estas sociedades? (Beja-Pereira-2003).

En los humanos, los estudios epidemiológicos mostraron que el desarrollo cultural del consumo de leche precedió a la aparición de la persistencia de la lactasa (Holden-1997). Como la vaquería se cree que empezó hace unos 100.000 años, la presión selectiva tuvo lugar solamente en las últimas 400 generaciones. A pesar de este corto período de tiempo, hay bastante información para la selección positiva reciente: la persistencia de la lactasa se asocia con un haplotipo muy común solamente en el norte europeo y que es distante del haplotipo ancestral (Harvey-1998, Hollox-2001). El descubrimiento de la posible base molecular de este polimorfismo - un cambio de un solo nucleótido SNP 14 kb más lejos del gen - permitió análisis más detalladas de la variante genética asociada con la persistencia/no persistencia de la lactasa (Enattah-2002, Poulter-2003, Bersaglieri-2004).

Es difícil demostrar que el gen de la lactasa sufrió una selección positiva reciente en el norte europeo. Como es un cambio regulador reciente, no son válidos los métodos basados en los codones que examinan el patrón de sustitución diferente a lo largo de un gen. En cambio, se tienen que utilizar métodos basados en la frecuencia de los alelos, que son vulnerables al hecho de que los patrones de frecuencia producidos por la selección pueden también ser producidos por procesos demográficos, como los cambios en el tamaño poblacional o por el cambio genético.

Para superar estas dificultades, se ha desarrollado un método estadístico llamado “la homocigosidad haplotípica relativamente extendida” (*REHH*), que se basa en el hecho de que un haplotipo seleccionado (un haplotipo en el cual ocurrió una mutación benéfica relativamente reciente, mutación que se elevó a una alta frecuencia) tendrá un rango extendido de desequilibrio de ligamiento en comparación con otros haplotipos de la población (Sabeti-2002).

Esto ocurre porque el haplotipo seleccionado es joven y porque no hubo bastante tiempo para que la recombinación lo rompa. Se supone que este haplotipo joven fue elevado a una alta frecuencia por la selección positiva.

Considerando que los americanos descendientes de africanos y asiáticos tienen una diversidad fenotípica similar a la población “europea” pre-consumidora de leche, se ha calculado un coeficiente de selección de 1,4-15%, consistente con el 5% previamente encontrado, utilizando un modelo de co-evolución genética y cultural (Auki-1986). ¿Realmente los primeros granjeros, que practicaban la lechería, se basaban tanto en la leche? No hay pruebas genéticas de que lo hicieron y todavía no está claro porqué la leche era tan importante (Hollox y Swallow-2002).

La mayoría de los estudios se han concentrado en la persistencia de la lactasa en Europa, por motivos prácticos, pero la persistencia de la lactasa también es común en algunas tribus de África que tienen una historia de lechería. ¿Está la persistencia de la lactasa en estos pueblos causada por la misma mutación (como podría ser probable) y sufrió también selección positiva?

A la primera parte de esta pregunta respondió Mulcare *et al.* con un trabajo (Mulcare-2004) donde se muestra que el alelo posiblemente causante, situado a 14 kb del gen de la lactasa, no tiene frecuencias suficientemente altas para ser el alelo responsable en África, aún cuando se tomen en cuenta los errores inherentes a la prueba de tolerancia a la lactosa. Esto podría tener dos explicaciones: o el alelo no es causativo para nada y sólo está fuertemente asociado con el alelo causativo, o en los africanos la persistencia de la lactasa se debe a otra mutación.

La primera razón es posible, especialmente dado que el desequilibrio de ligamiento es muy alto en la región y muchos polimorfismos en esta región estarían fuertemente asociados con la persistencia de la lactasa sólo por estar en el mismo haplotipo gigante.

La segunda razón, es decir la presencia de una mutación diferente en los africanos, parece poco probable intuitivamente, porque dada la fuerte ventaja selectiva de ser persistente de la lactasa, es poco probable que se perdiera cualquier mutación con el cambio genético. Es posible que otra mutación en el mismo elemento regulador o en un elemento diferente o incluso en un factor transcripcional accionando *trans*-, fueran los factores responsables para la persistencia de la lactasa en africanos (Hollox-2002).

En este caso tenemos un fenotipo clínico claro (tolerancia a la lactosa) con un componente genético mendeliano muy fuerte (el polimorfismo de persistencia/no persistencia de la lactasa) y un candidato genético bien definido (el gen de la lactasa-LCT). El polimorfismo causante más probable está localizado a 14 kb más lejos en un L2 repetición dentro del intrón de otro gen. Está siendo muy difícil de descubrir este polimorfismo causante en todas las poblaciones y además no parece ser el mismo en todas ellas.

1.2.6. Diagnóstico diferencial de la hipolactasia de tipo adulto

En el **diagnóstico diferencial** de la malabsorción a la lactosa se incluyen varias enfermedades (tabla 1.5).

Tabla 1.5. Los principales diagnósticos diferenciales par a la hipolactasia de tipo adulto

1.	Alactasia congénita
2.	El síndrome del intestino irritable
3.	Enteritis regional
4.	Colitis ulcerativa
5.	Neoplasia intestinal o pólipos intestinales
6.	Enfermedad diverticular
7.	Iatrogénicas: la ingesta de laxantes o de salvado
8.	Trastornos de la movilidad intestinal por endometriosis, adhesiones o masas previas
9.	Enfermedad celíaca
10.	Sprue tropical
11.	Infecciones virales (rota virus), bacterianas y parasitarias (giardia)

El **déficit congénito de la lactasa** y el **síndrome del intestino irritable** tienen síntomas muy similares (Bohmer-2001). El **déficit congénito de la lactasa** es fácil de distinguir de la hipolactasia de tipo adulto, pues se manifiesta como una diarrea severa durante el amamantamiento en los primeros días de vida y sin cuidados hospitalarios conduce a una deshidratación severa. La diarrea conduce a un peso bajo mientras se sigue dando la leche con lactosa al paciente.

El **síndrome del intestino irritable** y la intolerancia a la lactosa son condiciones comunes en la población adulta de todo el mundo y sus síntomas abdominales se solapan considerablemente (Vernia-2004). En algunos estudios se encontró un aumento de la prevalencia de la intolerancia a la lactosa en el síndrome del intestino irritable (Vesa-1998, Bohmer-1996), sugiriendo que la asociación de estas dos condiciones podría ser algo más que simple coincidencia. Sin embargo, en la mayoría de las series, se encontró la misma prevalencia de la malabsorción a la lactosa que la esperada en la población general (Vernia-1995). La importancia real de la malabsorción a la lactosa en el síndrome del intestino irritable está mal definida, pero muchos pacientes se quejan de intolerancia a la leche. La malabsorción a la lactosa probablemente provoca síntomas abdominales, debido a que los pacientes con el síndrome de intestino irritable son, realmente, hipersensibles a la distensión del gas intestinal, como también a otros estímulos (Whitehead-1980, Kellow-1988). Una dieta de restricción a la lactosa se sugiere a menudo solamente en base a esto (Parker-2001), mientras que un test de tolerancia a la lactosa se incluye en el diagnóstico de los pacientes con el síndrome de intestino irritable sólo cuando la diarrea es el síntoma predominante (Drossman-1997).

1.2.7. Patologías asociadas con el déficit de la lactasa de tipo adulto

Varios autores han descrito la **asociación** entre los genotipos de lactasa en el desarrollo de la **osteoporosis** (Enattah-2004, Obermayer-Pietsch-2004, Enattah-2005), **catarata** (Fontana-1995), tipo 1 y 2 de **diabetes** (Enattah-2004) y **cánceres de colon** (Rasinperä-2005) y **ovárico** (Kuokkanen-2005), enfermedades en las cuales la asociación entre la persistencia/no persistencia de la lactasa era controvertida o totalmente desconocida (Black-2002, Corazza-1995, Goulding-1999, Meloni-1999, Meloni-2001, Cramer-2000, Risch-1994, Herrington-1995).

No se ha encontrado ninguna asociación entre el genotipo C/C-13910 (baja actividad lactásica) y la densidad mineral ósea y **fracturas** en hombres jóvenes (Enattah-2004). Sin embargo, se ha demostrado una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo C/C-13910 y la densidad mineral ósea reducida en las mujeres postmenopáusicas por un lado y también con las incidencias de las fracturas en la gente muy mayor (>85 años) (Obermayer-Pietsch-2004, Enattah-2005).

Partiendo de la hipótesis de que el consumo de leche en los sujetos con persistencia de la lactasa se asocia con un riesgo aumentado de **catarata** (Simoons-1982, Rinaldi-1984), se ha sugerido que la hipolactasia podría ser un factor protector en la aparición de la catarata. Se ha observado la formación de la catarata en animales alimentados con grandes cantidades de galactosa (Kechrid-1986, Birlouez-Aragon-1989) y en los humanos con un defecto congénito del metabolismo de la galactosa (la ausencia o una disminución grande de la galactokinasa hepática o de la galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa) (Skalka-1980). Se ha considerado la diabetes como un factor acelerador en esta patología (Birlouez-Aragon-1993). Sin embargo, otros estudios han demostrado que no hay ninguna relación entre la absorción de la lactosa y la catarata (Bengtsson-1984, Lisker-1988, Fontana-1995).

Dado que la frecuencia de diabetes tipo 1 es la más alta en el mundo en las poblaciones de Finlandia y de Sardinia, se ha sugerido que la absorción de la lactosa pudiera estar asociada con el **tipo 1 y 2 de diabetes**; realizándose el análisis genético para los genotipos de la lactasa en más de 1400 pacientes con tipo 1 de diabetes y en más de 600 pacientes con tipo 2 de diabetes y se ha encontrado una asociación en la población de Sardinia (Black-2002) pero ninguna asociación entre los genotipos de persistencia de la lactasa y el tipo 1 o el tipo 2 de diabetes en la población finlandesa (Enattah-2004).

Los datos sobre el riesgo que representa la lactosa en el desarrollo del **cáncer de colon** son pobres. Un estudio de casos y controles realizado en pacientes con cáncer de colon de tres poblaciones diferentes: británica, finlandesa y española y sus pares combinados de controles, han revelado un riesgo significativo de padecerlo asociado con el genotipo C/C-13910 (con baja actividad lactásica) en la población finlandesa ($p > 0,007$). Una hipótesis explicativa podría ser

que este riesgo fuera causado por el alto consumo de productos lácteos en los finlandeses (Rasinperä-2005). Los adeptos de la teoría evolucionista se preguntan si la lactosa como nutriente representa un beneficio para los adultos con baja actividad lactásica o no.

Otra enfermedad que se ha asociado con la habilidad de digerir la lactosa es el **cáncer ovárico** (Cramer-1989, Cramer-1994, Kushi-1999). La razón de esta hipótesis se basa en el hecho de que la galactosa, el metabolito de la lactosa, que es un tóxico para las células epiteliales ováricas, se considera una toxina ovárica (Chen-1981, Swartz-1988, Meloni-1999). Además, las mujeres galactosémicas, que no presentan la actividad de la galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa, desarrollan una menopausia temprana (Kaufman-1981). Sin embargo, se ha publicado un estudio que demuestra la falta de asociación entre la ingesta de galactosa y el cáncer ovárico (Herrington-1995). Además, la asociación entre los genotipos de la lactasa en los pacientes con cáncer ovárico de tres poblaciones: finlandesa, polaca y sueca y sus pares de controles combinados, no han mostrado un riesgo aumentado de los genotipos C/T-13910 y T/T-13910 en el cáncer ovárico (Kuokkanen-2005).

1.2.8. Sintomatología e intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactasa fue descrita por la primera vez por **Hipócrates**, pero esta condición se reconoció y se diagnosticó sólo en los últimos 50 años (Cuatrecasas-1965, Cook-1966, Fauchi-1998, Srinivasan -1998, Campbell-2001, Bohmer-2001, Jarvis-2002). A pesar de la gran cantidad de investigaciones realizadas desde los setenta (Bayless-1975, Solomons-1979, Cavalli-Sforza-1987, Rosado-1987, Martín-1988, Suarez-1995, Hertzler-1996, Vesa-1996, Briet-1997, Suarez-1997, Vesa-1997, Suarez-1998, Pribila-2000, Peuhkuri-2000, Hertzler-2003, Jarvinen-2003, Vonk-2003), todavía prevalecen conceptos erróneos sobre la intolerancia a la lactosa (McBean-1998).

La intolerancia a la lactosa se define como la presencia de síntomas inducidos por la lactosa como: dolor y distensión intestinal, borborismos, flatulencia, náusea y vómitos, diarrea, en ocasiones más estreñimiento que diarrea debido a la motilidad intestinal reducida (Kretchmer-1971, Fauchi-1998, Srinivasan -1998, Campbell-2001, Bohmer-2001, Jarvis-2002). La intolerancia a la lactosa provoca también síntomas sistémicos, entre los cuales mencionamos: cefalea, pérdida de la concentración, dificultad en la memoria de corta duración, cansancio severo, dolor muscular y articular, varias alergias, arritmia, úlceras bucales, dolor de garganta etc. (Grimbacher-1997, Matthews-2000a Matthews-2000b, Campbell-2001, Treuder-2003, Matthews-2004). Estos síntomas tienen una prevalencia que varía entre 20%-100% (Matthews-2005).

Es importante aclarar la diferencia entre la **hipolactasia**, es decir el nivel bajo de lactasa y la intolerancia clínica a la lactosa (Matthews-2005). La **malabsorción** a la lactosa (la digestión incompleta de la lactosa debido a los niveles bajos de β -galactosidasa) no es sinónimo de **intolerancia** a la lactosa (la presencia de síntomas) (Lovelace-2005). La no persistencia de la lactasa de tipo adulto, que ocurre en una gran parte de la población del mundo, conduce a la malabsorción a la lactosa, que puede, a su vez, en algunos casos pero no en todos, llevar a la intolerancia a la lactosa (He-2006).

Muchos estudios han detectado que la mayoría de las personas que tienen maldigestión de la lactosa no experimentan síntomas de intolerancia a la lactosa después de consumir cantidades moderadas de lactosa (Rosado-1987, Vesa-1996, Suarez-1995^a, Suarez-1997, Scrimshaw-1988, Vesa-2000, Peuhkuri-2000, Buchowski-2002, Hertzler-2003, Jarvinen-2003). Por ejemplo, en un estudio aleatorizado, doble ciego, realizado en individuos que creían que eran severamente intolerantes a la lactosa, los participantes consumieron 8 onzas de leche (sin lactosa y con lactosa) en el desayuno, durante una semana. No se observaron diferencias significativas en la respuesta entre la leche sin lactosa o con lactosa (12 g) para los síntomas como la hinchazón, flatulencia y el dolor abdominal (Suarez-1995a).

Además de los hallazgos de que muchos malabsorbentes a la lactosa no experimentan síntomas de intolerancia a la lactosa después de cargas moderadas de lactosa, proporciones sustanciales (hasta 62%) de los que pensaban que eran intolerantes a la lactosa realmente podían digerir normalmente la lactosa (Bayless-1975, Rosado-1987, Suarez-1995a, Peuhkuri-2000, Carroccio-1998, Saltzman-1999). Mientras que los síntomas como diarrea, hinchazón o flatulencia pueden aparecer como resultado de la maldigestión de la lactosa, éstos no son específicos de maldigestión de la lactosa y se pueden experimentar también después de la ingesta de otros alimentos (Lovelace-2005).

Independientemente de si aquellos que creen tener intolerancia a la lactosa experimentan realmente los síntomas cuando son testados en condiciones a ciegas, la intolerancia percibida a la lactosa puede ser tan importante como la intolerancia real a la lactosa, porque siguiendo los cambios dietéticos se puede comprometer la ingesta de calcio (Lovelace-2005). Según Saltzman *et al.* (1999), más de 40% de los sujetos con intolerancia a la lactosa auto-comunicada fueron absorbentes de la lactosa.

En la década pasada, los resultados de los ensayos controlados y enmascarados, establecieron que la gran mayoría de los individuos que maldigieren la lactosa pueden consumir cantidades moderadas de alimentos que contienen lactosa sin presentar síntomas de malestar (Suarez-1995a, Vesa-1996, Suarez-1997, Jarvinen-2003, Peuhkuri-2000). Sin embargo, a pesar de esta prueba, mucha gente piensa que es intolerante a la lactosa y la prevalencia de esta creencia está aumentando (McBean-1998). Es difícil de identificar las razones que están detrás de este aumento aparente, pero podrían estar relacionadas, parcialmente por lo menos, con el aumento en la publicidad de ésta condición, así como con la disponibilidad y la promoción de los productos para los individuos intolerantes a la lactosa. (Lovelace-2005).

En la mayoría de los casos, el **diagnóstico de la intolerancia a la lactosa** del médico se basa en una descripción de los síntomas. Esta confianza en una evaluación subjetiva tanto por parte de los médicos como por parte de los pacientes, significa que algunos de los pacientes no sean ni malabsorbentes a la lactosa ni intolerantes a la lactosa. Para aquellos individuos que digieren normal la lactosa, el uso de los métodos objetivos de diagnóstico podría, en consecuencia, reducir la prevalencia del error de diagnóstico. Sin embargo, es controvertido si estos métodos se deberían emplear como un componente de rutina del diagnóstico. Con respecto a este asunto, es importante considerar si un diagnóstico confirmado alteraría el manejo de la condición. Esto podría ocurrir para aquellos que pueden digerir la lactosa; a ellos no se les aconsejaría evitar el uso de los alimentos que contienen lactosa. Aún mas, éste consejo también parece apropiado para los que no digieren la lactosa; investigaciones recientes indican que la eliminación de los alimentos que contienen la lactosa no es necesaria y que la mayoría de los malabsorbentes a la lactosa toleran cantidades útiles sin síntomas notables (Rosado-1987, Suarez-1995a, Vesa-1996, Suarez-1997, Vesa-2000). En un estudio doble-ciego (Suarez-

1995a), los síntomas experimentados después de la ingesta de un vaso de leche con una comida no diferían cuando se consumía leche sin lactosa de la leche con lactosa.

Aunque trabajos bien diseñados no revelan ninguna relación entre la dosis y los síntomas a dosis relativamente pequeñas (Suarez-1995b, Vesa-1996, Suarez-1997), otros estudios con dosis grandes indican una relación dosis-dependiente (Gudmand-Hoyer-1977, Hertzler-1996). Entonces, es posible que algunos individuos hayan experimentado síntomas severos en una o más ocasiones después de sobrecargas grandes de lactosa, resultando el diagnóstico de intolerancia a la lactosa. Siguiendo un diagnóstico así, ellos podrían haber llegado a anticipar los síntomas después de la ingesta de cantidades pequeñas de lactosa.

Alternativamente, otra investigación sugirió que los individuos que experimentan síntomas podrían tener tractos gastrointestinales “sensibles” y que esta sensibilidad se atribuye equivocadamente a la lactosa (Suarez-1996). Entonces, el consejo a los individuos que piensan que son intolerantes a la lactosa se podría focalizar en cómo se incluirían los alimentos con contenido en lactosa en la dieta sin producir malestar y las necesidades no diferirían entre los que se encuentran absorbentes o malabsorbentes a la lactosa, en base a un test de tolerancia a la lactosa.

También se sabe hace tiempo que hay una gran variabilidad en los síntomas de intolerancia a la lactosa en los individuos con maldigestión de la lactosa, medido mediante tests objetivos como el BH₂T. Las diferencias en los síntomas se atribuyeron a las diferencias en el tiempo de tránsito intestinal y en el procesamiento colónico de la lactosa mal digerida (Labayen-2001, Ladas-1982, Johnson-1993, Hertzler-1996). Varios informes indican que los individuos con maldigestión de la lactosa se pueden adaptar y tolerar un consumo aumentado de lactosa si la leche se toma en cantidades gradualmente incrementadas (Hertzler-1996, Jonson-1993, Pribila-2000). El mecanismo de adaptación se supone que se debe a una tolerancia aumentada a los productos de la fermentación de la lactosa (Sibley-2004).

El **origen de los síntomas de intolerancia a la lactosa** no se conoce completamente. Hay autores que opinan que la carga osmótica causada por la lactosa no digerida no puede ser considerada el único mecanismo responsable de los síntomas, porque la intolerancia a la lactosa se relaciona poco con la malabsorción a la lactosa (de Vrese-2001). Esto está apoyado por el estudio de Vonk (2003), en el cual se observó que los sujetos intolerantes a la lactosa con síntomas leves o con diarrea, no difirieron en el grado de digestión de la lactosa en el intestino delgado ni en el tiempo de tránsito oro-cecal (Vonk-2003). Basándose en estas observaciones, se sugirió que, además de la capacidad de digestión de la lactosa en el intestino delgado, el procesamiento colónico de la lactosa maldigerida podría desempeñar un papel en la intolerancia a la lactosa (He-2006).

En los individuos con actividad lactásica reducida por déficit primario o secundario de lactasa, la lactosa excesiva consumida en la leche o en los productos lácteos ricos en lactosa, no puede ser digerida en el intestino delgado debido al nivel reducido de la lactasa. Las bacterias en el íleon distal y en el colon fermentan la lactosa no digerida para producir ácidos grasos de cadena corta, hidrógeno, metano (en los no productores de hidrógeno) y dióxido de carbono. Los productos fermentativos y las moléculas de lactosa no digerida pueden provocar síntomas característicos de intolerancia a la lactosa (Sibley-2004).

Como ya dijimos, al hablar del metabolismo de la lactosa y de la fisiopatología de la deficiencia de la lactasa, la ausencia o disminución de actividad de la beta-galactosidasa va a dar lugar a la presencia del disacárido en el intestino grueso, siendo fermentado por la flora bacteriana. Los productos resultantes de esta fermentación van a condicionar el cortejo sintomático característico de la clínica de esta deficiencia, como el dolor abdominal, la diarrea, las náuseas, los vómitos, la distensión abdominal, el eructo y el flato.

En general, cabría esperar que el grado de malabsorción de la lactosa o deficiencia de su enzima, lactasa, iría paralelo a la capacidad de producir sintomatología intestinal, pero esto no es siempre así, ya que existen un número de factores e interacciones que van a condicionar la presencia o no de síntomas, descendiendo la correlación entre malabsorción e intolerancia (figura 1.7).

Entre estos **factores** están:

1-La actividad del enzima lactasa. Si todavía persiste actividad de la disacaridasa los síntomas serán más leves, porque parte de la lactosa se hidrolizará y absorberá.

2-La carga de lactosa consumida. Cuando la cantidad de lactosa ingerida no supera en mucho la actividad lactásica, la concentración de azúcar no absorbido en el colon será menor y los síntomas subsiguientes menos intensos. La ingesta de 50 g de lactosa en el test clínico de tolerancia a la lactosa, causa síntomas en 80% hasta 100% de los malabsorbentes a la lactosa (Jussila-1969b, Bayless-1975, Newcomer-1978, Sahi-1978) y aproximadamente una tercera parte hasta la mitad de los malabsorbentes presentan síntomas después de la ingesta de 200-250 ml de leche (Savaiano-1987). Se observó en muchos estudios que la ingesta de leche con lactosa hidrolizada redujo los síntomas en comparación con la ingesta de leche normal (Suárez-1995b). La pregunta que se quedó sin respuesta hasta ahora es la siguiente: ¿cuál es la cantidad más pequeña de lactosa que puede causar síntomas? Se estudiaron los síntomas que aparecieron en los malabsorbentes a la lactosa, después de la ingesta de hasta 7 g de lactosa junto con leche sin grasa (Vesa-1996). La leche de control, completamente sin lactosa, indujo síntomas en el mismo número de sujetos que la leche conteniendo 7 g de lactosa y no se observó ninguna diferencia en la severidad de los síntomas. Hertzler *et al.* (Hertzler-1996) encontró una media más alta de la

excreción del hidrógeno espirado después de la ingesta de 6 g de lactosa que después de la ingesta de 2 g, indicando por lo menos una maldigestión parcial de la lactosa cuando se administra en dosis más altas. Sin embargo, los valores iniciales bastante altos de hidrógeno espirado, de aproximadamente 20 ppm, complican la interpretación de estos resultados. Los sujetos no presentaron más síntomas después de la ingesta de 6 g de lactosa que después de g o de ningún gramo. Suárez *et al.* (Suárez-1995a, Suárez-1997) no encontró ninguna diferencia en los síntomas después de la ingesta diaria de uno o dos vasos de leche normal o sin lactosa, con la comida. Incluso después de la ingesta de grandes cantidades de lactosa, una proporción pequeña de malabsorbentes quedan sin síntomas (Scrimshaw-1988). No se conoce la explicación, pero la presencia de sujetos sin síntomas es una observación común, relacionada con la ingesta de otros carbohidratos malabsorbidos. Así, solamente la mitad de los malabsorbentes a la fructosa presentan síntomas abdominales después de la ingesta de 50 g de fructosa (Suárez-1997) y después de 25 g de fructosa y 5 g de sorbitol (Nelis-1990). Muchos estudios demostraron que la leche baja en lactosa o la leche sin lactosa es mejor tolerada que la leche que contiene lactosa, pero hay otros estudios más recientes que no encontraron ninguna diferencia en la tolerancia de estas leches (Suárez-1995a, Vesa-1996, Suárez-1997) ni demostraron la posibilidad de un efecto placebo (Briet-1997).

3-El rango de presentación de lactosa al intestino delgado. Cuanto más tiempo esté el azúcar en contacto con las vellosidades del enterocito, mayor es la probabilidad de una adecuada hidrólisis y, por tanto, de sintomatología más leve; esto se apoya en la demostración de que una alimentación continua producía menores concentraciones de hidrógeno espirado que los “bolus” (Lifschitz-1982). También se observó que el tiempo de vaciado gástrico de la lactosa para las personas deficientes de lactasa era más rápido que un volumen equivalente de glucosa (Welsh-1977), y que la cirugía del estómago puede enmascarar la intolerancia en sujetos deficientes de lactasa o causarla en sujetos con normal actividad del enzima al acelerar el tiempo de vaciado gástrico (Bergoz-1979).

4-El vehículo de la lactosa. Las diferencias en la presentación de síntomas o no, según la forma de administración de la lactosa, son debidas al contenido graso, las distintas osmolaridades y la presencia de otros azúcares, que podrían retrasar el vaciamiento gástrico. Se ha demostrado que la lactosa se tolera mejor si se toma con otros alimentos, que la leche con chocolate es mejor aceptada que sola, y que después de la administración de lactosa en agua, leche desnatada y leche entera, la frecuencia de síntomas iba en descenso, progresivamente (Lifschitz-1982, Bedine-1972, Martín-1988 Leichter-1973).

5-La velocidad del tránsito intestinal. Cuando la velocidad del tránsito intestinal está acelerada, el tiempo de contacto entre el sustrato y el enzima es menor, disminuyéndose la digestión, por lo que la sintomatología sería más grave.

6-La actividad metabólica de la flora colónica o la compensación colónica. La exposición de la flora colónica a lactosa no absorbida podría conducir a cambios cuantitativos y cualitativos en la fermentación del azúcar por estos ecosistemas, causando variaciones en el grado de producción de diarrea o gas. No se sabe si el cambio se produce por inducción de los microorganismos ya existentes o es un cambio en la población bacteriana (Saavedra-1989, Savaiano-1989), pero se ha postulado que la lactasa bacteriana podría ser inducida y la flora colónica metabolizaría el disacárido (Perman-1981).

También se ha observado que una administración prolongada de carbohidratos no absorbibles desciende el pH fecal y la producción de hidrógeno *in vivo* e *in vitro* en incubaciones de heces (Perman-1981). Así se ha especulado que, manteniendo largo tiempo el pH colónico ácido por la dieta, podría ocurrir una conversión de la flora bacteriana a tipos acidofílicos capaces de degradar los carbohidratos por patrones fermentativos alternativos.

La adaptación bacteriana colónica se ha observado en animales y en humanos. En ratas cedió la diarrea después de la ingestión continuada del 17% de lactosa, y en negros nigerianos se produjeron síntomas al introducir el helado y desaparecieron después de varios meses de consumo. La beta-galactosidasa bacteriana puede incrementarse en 3 0 6 veces, durante esos experimentos.

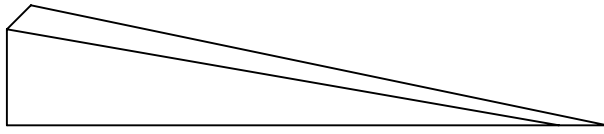
7-Subjetividad. La malabsorción puede ser fácilmente identificada por pruebas objetivas, pero los síntomas dependen de la percepción individual, excepto cuando la diarrea es prominente. Los factores psicodinámicos deben tenerse en cuenta cuando la intolerancia a la lactosa es sospechada como causa de la sintomatología gastrointestinal y el diagnóstico se debe evidenciar objetivamente mediante el test de hidrógeno espirado positivo.

Por tanto, hay personas que tienen hipolactasia sin síntomas y personas que no pueden tolerar la lactosa, aún cuando es hidrolizada y absorbida (Arola-1989). La cantidad de lactosa que provoca síntomas varía considerablemente entre los diferentes individuos, por tanto el umbral de tolerancia no parece estar bien correlacionado con la actividad de lactasa (Solomons-1985).

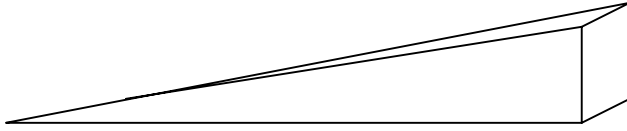
Una historia de sintomatología gastrointestinal tras la ingesta de productos lácteos no predice la capacidad para absorber la lactosa, como tampoco lo hace la historia de su consumo (Reddy-1972, Stephenson-1974, Bayless-1975, Garza-1976, Paige-1977, Barr-1979, Solomons-1985, DiPalma-1988). En la mayoría de las ocasiones el paciente no relaciona los síntomas con la ingesta de estos alimentos (Solomons-1985).

Sin embargo, las personas malabsorbentes podrían tender, consciente o inconscientemente, a eliminar la leche y los derivados progresivamente de su dieta habitual (Bayless-1975, Paige-1977), con importantes repercusiones nutricionales sobre la salud.

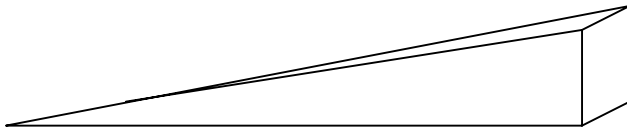
Sin síntomas-----Síntomas graves



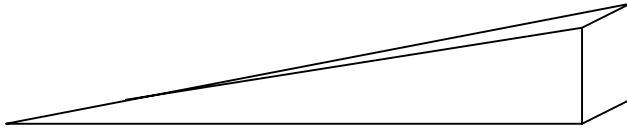
Actividad de la lactasa



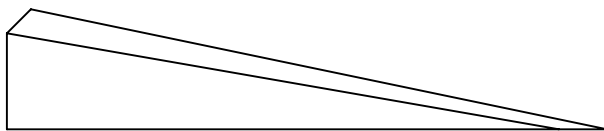
Carga de lactosa



Velocidad de vaciamiento gástrico



Velocidad del tránsito



Compensación colónica

Figura 1.7. Factores determinantes de los síntomas en la intolerancia a la lactosa

1.2.9. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DEL DÉFICIT DE LACTASA DE TIPO ADULTO

La sospecha clínica de malabsorción a la lactosa se apoya en la presencia de un cortejo sintomático, caracterizado por distensión y dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, flatulencia, fundamentalmente después de la ingesta de leche o derivados lácteos, ricos en lactosa. El diagnóstico final se establece después de la estimación de la actividad enzimática, mediante tests directos o indirectos (Solomons-1978, Levitt-1969).

1. ANÁLISIS DE LAS HECES

1.1. Presencia de cuerpos reductores

La detección de cuerpos reductores en las heces para el diagnóstico de malabsorción de la lactosa, se apoya en la base fisiopatológica de la búsqueda de productos resultantes de la fermentación por las bacterias intestinales del disacárido no absorbido. Esto se realiza mediante unas pastillas reactivas (Clinitest R), produciéndose una reacción positiva entre éstas y las sustancias reductoras. Se considera sugestiva de malabsorción de la lactosa, la presencia de 0,5% de cuerpos reductores en heces (Lebenthal-1981). Este es un método cualitativo, de rápida ejecución, pero poco sensible y específico, ya que puede ser alterado por múltiples factores, como son:

1. La cantidad de agua en las heces, que diluiría la concentración de los cuerpos reductores.
2. La velocidad del tránsito intestinal, que se ve disminuida con la edad, dando tiempo a que las bacterias continúen su acción, disminuyendo la capacidad reductora de éstas sustancias.
3. Por otro lado, esta técnica no permite detectar grados medios o moderados de malabsorción (Newcomer-1984).

1.2. Detección de heces

La determinación del pH de las heces es otro medio cualitativo, complementario del anterior, ya que se intenta detectar los ácidos orgánicos resultantes de los carbohidratos no absorbidos por la flora intestinal. La presencia de ácido láctico, butírico, propiónico y/o acético en las heces, se traducirá en un pH más ácido de las mismas (Caballero-1983). La determinación se hace mediante tiras de papel reactivas, considerándose un pH inferior a 6 sugestivo de malabsorción de lactosa. Este método tiene los mismos inconvenientes que el anterior, debiéndose tener en cuenta que en el colon de los adultos se absorbe el 80% de los ácidos orgánicos producidos en la luz, dando lugar a gran número de falsos negativos (Lebenthal-1981).

1.3. Excreción fecal de ^{14}C

Se basa en la detección de ^{14}C en las heces, después de la administración de lactosa marcada con este isótopo. Para su medición se recogen las heces durante cuatro días, se homogeneizan y se mide la radioactividad total, índice de la presencia del ^{14}C , por medio de su combustión en un Tri-carb Oxidador (Packard Instruments, Inc) (Bond-1976). La presencia en las heces de menos de 1-5% del isótopo administrado es índice de buena absorción del disacárido, mientras que cantidades superiores al 13% indicarán malabsorción del azúcar. Este método presenta múltiples inconvenientes, puesto que se utiliza material radioactivo, es un proceso largo y laborioso, y además, a pesar de pretender ser un método semicuantitativo, presenta una pobre correlación entre los gramos de lactosa marcada no absorbida y la cantidad del isótopo excretado, ya que la fermentación del disacárido en el colon producirá también CO_2 y este gas difunde rápidamente al torrente sanguíneo (Bond-1976, McGill-1983).

2. ANÁLISIS EN LA ORINA

2.1. Determinación de la lactosa en orina

Este método no se ha hallado eficaz, ya que en muchos casos de malabsorción del azúcar no se encontró lactosa en la orina y por el contrario, en niños con actividad lactásica normal, puede detectarse lactosuria después de la administración de grandes dosis del azúcar. Así mismo, la lactosuria puede aparecer en cualquier patología que suponga una alteración de la mucosa intestinal (Lebenthal-1981).

2.2. Medición de galactosa en orina

Se basa en la detección de concentraciones de galactosa en orina tras la administración de 50 g de lactosa en 400 ml de agua y 150 mg de etanol. Tras 40 minutos se toma una muestra de orina y se introduce una tira reactiva, leyéndose a los 12 minutos, si se tiñe de color azul, se considera positiva, y si no se colorea o se torna verde, negativa (Arola-1982). Este es un método de gran especificidad y sensibilidad, pero no muy preciso para el diagnóstico de malabsorción de lactosa (Scrimshaw-1988), además necesita de la utilización de alcohol, lo que supone limitaciones en su uso.

3. TEST DE ABSORCIÓN DE LACTOSA

La capacidad para hidrolizar la lactosa puede ser también medida por el test de absorción, antes llamado **test de tolerancia**, que era el test tradicionalmente utilizado para el diagnóstico de malabsorción de lactosa. El estándar se realizaba midiendo la glucemia basal después de una noche de ayuno, que sería el punto 0 del test, y realizando determinaciones a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la administración de 2 g lactosa/kg peso en solución acuosa

por vía oral, hasta un máximo de 50 g. Una elevación inferior a 1.2 mmol/l o 20% se consideraría curva plana y significativa de malabsorción del azúcar (Newcomer-1975).

La aparición de falsos positivos es un problema frecuente con esta técnica, ya que los niños con malabsorción primaria a la glucosa o a la galactosa también podrían ser positivos en este test, por lo que si se sospechara uno de estos casos, debería realizarse un test de tolerancia a glucosa previo (Newcomer-1975).

Por otro lado, la aparición de falsos negativos ocurrirá en todas aquellas personas con alteraciones del metabolismo de la glucosa (diabetes mellitus).

Múltiples factores pueden influir en el resultado de esta prueba:

1. El tipo de anticoagulante utilizado en la recogida de las muestras.
2. El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra de sangre y la separación del plasma.
3. La temperatura a la que se conserva la sangre hasta la medición.
4. El uso de plasma o suero en las mediciones.
5. El método de laboratorio empleado (Welsh-1966).

Debido a la alta incidencia de falsos positivos y falsos negativos, se considera un mal indicador del déficit del enzima (Lebenthal-1981, Newcomer-1975).

Una variante del método anterior es el **Test de Absorción de Lactosa con Etanol**, en el cual se administra previamente al azúcar una cantidad de etanol, que inhibirá la conversión intrahepática de galactosa en glucosa, lo que permite medir la elevación de la galactosa en sangre después de la ingesta de lactosa (McGill-1983). Este test presentó resultados similares o incluso, una mayor sensibilidad y especificidad con respecto al test tradicional, pero existe el gran inconveniente del empleo del alcohol, lo que impediría su uso indiscriminado, además la determinación bioquímica de galactosa es mucho más compleja que la de glucosa, manteniéndose muchas de las limitaciones de la técnica clásica (Lebenthal-1981).

4. ESTUDIOS DE IMAGEN

Ante la existencia de una mucosa normal, se podría aplicar este test, que no es más que otra variación del test clásico de tolerancia a la lactosa. Consiste en la administración de 115 g de sulfato de bario mezclados con 25 g de lactosa y la realización posterior de un examen radiológico del intestino delgado. Si existe malabsorción aparecerá la triada clásica (Morrison-1974) de:

1. Dilución del medio de contraste en el intestino delgado.
2. Aumento de la velocidad de tránsito hasta el ciego.
3. Dilatación y aumento del peristaltismo del intestino.

Este método es aconsejable debido a la alta incidencia de falsos positivos y negativos y a la necesidad de irradiación (Lebenthal-1981, Lisker-1975).

5. BIOPSIA INTESTINAL

Otra forma de determinación de la actividad lactásica es mediante la toma de muestras biópsicas del intestino delgado, unos cuantos centímetros después del ángulo Treitz y el análisis histoquímico de las mismas (Newcomer-1966). Esta técnica tiene como inconvenientes, que determina la actividad del enzima en una localización particular, además es una técnica invasiva y que requiere en la mayoría de los niños una exposición a la radiación (Doobins-1968).

6. ESTUDIOS DE PERFUSIÓN INTESTINAL CON LACTOSA

Este es un método cuantitativo, sofisticado y preciso para la absorción de lactosa a nivel intestinal. Se coloca, generalmente en el íleon proximal, mediante radioscopia, una sonda y se administra intraluminalmente un marcador no absorbible (generalmente polietilen-glicol) junto con 12.5 g de lactosa, que suele estar marcada con ^{14}C . El marcador no absorbible se usa como referencia de la desaparición del sustrato y del movimiento del agua en el intestino, que luego se compara cuantitativamente con lo ocurrido con una determinada cantidad de lactosa (McGill-1983). Posteriormente, se sitúa la sonda a nivel del íleon terminal y se realizan aspiraciones secuenciales cada 15 minutos, durante 3 horas, determinando en ellas la concentración de polietilen-glicol y ^{14}C , correlacionándose temporalmente. El cociente entre ambas concentraciones representa un índice de la lactosa no absorbida (Bond-1976).

Las diferencias entre la lactosa no absorbida, presente en el íleon terminal, en absorbentes y no absorbentes, son muy importantes, encontrándose de 0-8% en los primeros, frente al 42-75% en los malabsorbentes. Torun y sus colaboradores (Torun-1979) sostienen que este método es el más preciso de los considerados funcionales, obviando las interferencias que la velocidad del vaciado gástrico puede producir al administrar la lactosa directamente en el intestino.

Esta técnica tiene como inconvenientes su gran complejidad, su elevado coste e invasividad, por lo que queda reducida al uso en trabajos específicos de investigación o para la determinación de malabsorción de glucosa o galactosa (Lebenthal-1981, McGill-1983).

7. TEST DEL $^{14}\text{CO}_2$ ESPIRADO

Este método está basado en la determinación de la curva de $^{14}\text{CO}_2$ como índice de la capacidad del sujeto para hidrolizar la lactosa, después de la administración de (1- ^{14}C)-lactosa en 400 ml agua templada, ya que el primero es un trazador isótopico estable, que permite seguir el metabolismo de la glucosa tras la digestión de la lactosa (Lebenthal-1981, Sasaky-1970).

Se recogen muestras a los 0, 30 minutos y 1, 2, 3 y 4 horas después de la ingesta y se determina mediante un espectrofotómetro de masas la radioactividad del $^{14}\text{CO}_2$. El tiempo de recogida de muestras es muy importante, ya que tras 3-4 horas, la acción de las bacterias

colónicas sobre el azúcar marcado no absorbido, también produce CO_2 , con lo que las curvas entre absorbentes y no absorbentes se solapan (Bond-1976).

Dentro de los inconvenientes de este método está el uso de material radioactivo, la necesidad de instrumental analítico muy sofisticado, el elevado coste y que la especificidad de la prueba se ve influenciada por múltiples factores (Scrimshaw-1988, Sasaky-1970):

1. Actividad de la lactasa
2. Velocidad de absorción intestinal de la glucosa y de su transporte a otros órganos y tejidos
3. Tiempo de oxidación de la glucosa
4. Pool de glucosa en el organismo en ese momento
5. Equilibrio ácido-base durante la observación
6. Velocidad de excreción de CO_2 .

8. TEST DEL HIDRÓGENO ESPIRADO

(v. Material y métodos).

1.2.10. Tratamiento del déficit de lactasa de tipo adulto

El tratamiento de la intolerancia a la lactosa consiste primariamente en la evitación de los alimentos y en la atención con la ingesta de calcio y con los suplementos de calcio cuando se necesitan (Sibley-2004). Realmente, la adaptación cultural al consumo de leche resultó en prácticas dietéticas que incluían productos lácteos con contenido significativamente disminuido de lactosa (por ejemplo leche fermentada, yogur y muchos quesos). Una alternativa al tratamiento de la intolerancia a la lactosa es el suplemento enzimático o pre-digestión con lactasa derivada de fuentes microbianas (Lin-1993, Biller-1987, Scrimshaw-1988).

Mientras que el aumento de la concienciación de la prevalencia de la no persistencia de la lactasa tuvo como efecto un aumento de la detección de la intolerancia a la lactosa en los individuos susceptibles, existe la preocupación de que la evitación de los lácteos puede contribuir a la reducción de la densidad mineral ósea y a la osteoporosis. No está claramente definida la relación entre la maldigestión a la lactosa, la intolerancia clínica a la lactosa, la ingesta de calcio y el efecto sobre el metabolismo óseo (Newcomer-1978, Horowitz-1987, Jackson-2001, Jarvis-2002). Sin embargo, parece prudente apoyar a los individuos malabsorbentes que no presentan síntomas de intolerancia a la lactosa a continuar consumir una dieta que contenga productos lácteos (Sibley-2004). Este consumo de lácteos es particularmente prudente porque se reportó que la malabsorción a la lactosa no es un impedimento para la ingesta de 1500 mg de calcio en forma de productos lácteos (Suarez-1998).

1.2.10.1. Propuestas para el manejo terapéutico

Montalto *et al.* (Montalto 2006) sugirieron un esquema para el manejo terapéutico de la malabsorción a la lactosa, considerando los datos reunidos de la literatura (figura 1.8). Subrayamos que no todos los sujetos con deficiencia de la lactasa necesitan ser tratados, sólo los más sintomáticos, porque no hay otros efectos adversos conocidos más que los síntomas gastrointestinales agudos (Suarez-1995a). Además, la mayoría de la gente intolerante a la lactosa puede ingerir 12 g de lactosa diariamente (el equivalente de una taza de leche), sin experimentar síntomas adversos (Haverberg-1980, Vonk-2003).

Es necesario distinguir entre el déficit primario y secundario de la lactosa. En la forma **secundaria** es necesaria una dieta temporal libre de lactosa sólo hasta que se obtenga una recuperación completa de la condición patológica causativa. Se puede aconsejar el test de H₂ espirado para verificar la recuperación de la actividad enzimática (Montalto-2006).

En la **hipolactasia primaria** se debe considerar una estrategia terapéutica diferente, debido a la irreversibilidad de la condición. Inicialmente, se debería indicar evitar temporalmente la leche y los productos lácteos de la dieta, para obtener la remisión de los

síntomas. Posteriormente, se sugiere una reintroducción gradual de los productos lácteos, considerando la dosis umbral individual, para asegurar una ingesta adecuada de las sustancias nutritivas esenciales. Para elevar el umbral de la dosis se deberían considerar algunas estrategias farmacológicas y no farmacológicas. Los cambios en los hábitos dietéticos, como la ingesta de la leche junto con otros alimentos como los pasteles y el consumo de productos lácteos fermentados y madurados aseguran una ingesta adecuada de leche mientras previenen la aparición de los síntomas de intolerancia. El consumo crónico de leche parece ser útil y favorece la adaptación. Considerando la absorción de la lactosa dosis-dependiente, se recomienda la distribución de la cantidad de leche diaria en pequeñas tomas.

Si estas estrategias fracasan en reducir la intolerancia a la lactosa, son disponibles algunas terapias farmacológicas. La adición de la lactasa exógena en forma líquida durante la comida se demostró eficaz, efectiva y práctica. Se aconsejan también los preparados de leche pre-hidrolizados (por ejemplo la leche con bajo contenido en lactosa está en la venta). Las tabletas o las cápsulas de β -galactosidasa se recomiendan sólo para el consumo de los productos lácteos sólidos. Según los datos de la literatura, no se recomiendan otras estrategias farmacológicas. Se necesita un apoyo farmacológico de calcio y vitaminas, independientemente del planteamiento terapéutico elegido si no se asegura la ingesta diaria de productos lácteos (figura 1.8).

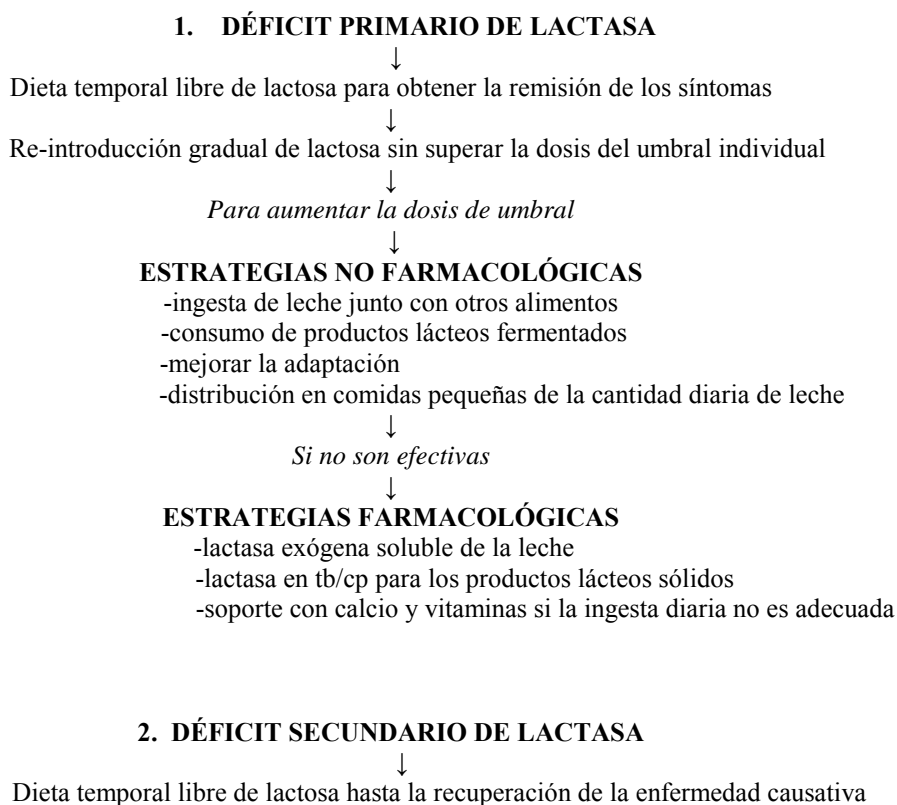


Figura 1.8. Propuesta de manejo terapéutico

1.2.10.2. Estrategias terapéuticas

En los pacientes con la no persistencia de la lactasa, el tratamiento se considera exclusivamente en la presencia de los síntomas de intolerancia a la lactosa (Nilsson-2004). En la ausencia de las guías clínicas, el planteamiento terapéutico mas común tiende a excluir la leche y los productos lácteos de la dieta (Montalvo-2006). Sin embargo, esta estrategia puede tener serias desventajas nutricionales, principalmente debido a la ingesta reducida de sustancias como el calcio, el fósforo y las vitaminas y podría ser asociada con una densidad mineral ósea reducida (Solomons-1985, Di Stefano-2002). Para superar estos límites se realizaron varios estudios para buscar alternativas como la **β -galactosidasa, el yogur y los prebióticos** por su actividad lactásica bacteriana, estrategias farmacológicas y no farmacológicas que podrían prolongar el tiempo de contacto entre el enzima y el substrato, alargando el tiempo de tránsito gastrointestinal y la ingesta crónica de lactosa para mejorar la adaptación del colon.

1.2.10.2.1. La β -galactosidasa exógena

La terapia de re-emplazamiento con lactasa exógena microbiana (obtenida de levaduras u hongos) representa una posible estrategia para la deficiencia primaria de la lactasa. Los enzimas se podrían añadir en una forma líquida a la leche antes de su consumo o administrados en una forma sólida (cápsulas o tabletas) junto con la leche y los productos lácteos. Se han realizado varios estudios añadiendo el enzima soluble a la leche algunas horas antes de su consumo, obteniendo así una “leche preincubada” (Rasinpera-2004, Reasoner-1981, Rask Pedersen-1982, Nielsen-1984, Onwulata-1989). Esta estrategia es efectiva en reducir tanto la excreción del hidrógeno espirado, como las manifestaciones subjetivas de malestar después de la ingesta de leche. No obstante, estos estudios se han llevado a cabo en series pequeñas poblacionales. No se han controlado con grupos placebo y los resultados no han sido comparables, como había una falta de homogeneidad en los subgrupos de pacientes. Aún más, la leche preincubada no se ha considerado práctica debido a la necesidad de añadir el enzima unas cuantas horas antes de su consumo. La leche baja en lactosa es leche preincubada en la cual la lactosa ya está pre-hidrolizada; este producto es disponible en el comercio pero no está distribuido en cualquier sitio (por ejemplo no en restaurantes, cafeterías etc). Para evitar estos problemas, se han realizado varios estudios para demostrar la efectividad de la terapia de re-emplazamiento aún cuando la lactasa se administra durante la comida (Payne-1981, Solomons-1985, Barillas-1987, Lin-1993, Corazza-1992).

En un ensayo cruzado, doble-ciego, controlado con placebo, en 30 sujetos intolerantes con malabsorción a la lactosa, se ha demostrado que la “leche preincubada” y la leche tratada

durante la comida son capaces de reducir significativamente el H₂ espirado y los síntomas de forma similar, sugiriendo que los enzimas se pueden utilizar durante las comidas por una práctica mejor (Montalvo-2005).

Mientras que la eficacia de la lactasa líquida exógena en reducir tanto la excreción de H₂ espirado como los síntomas de intolerancia se reconoce largamente, los resultados sobre la tasa exacta de eficacia son algo discordantes. Varios factores pueden justificar estas discrepancias. El origen diferente de los enzimas tiene su papel. Se conoce bien que a las mismas dosis, los enzimas obtenidos de microorganismos diferentes tienen una eficacia diferente en hidrolizar la lactosa. De hecho, estudios comparativos han demostrado ya la eficacia más alta de la lactasa derivada de *K. lactis* que la del enzima derivado de *A. Níger* (Rosado-1984, Solomons-1985). También se debe tomar en consideración la contribución de la actividad residual de la lactasa de la mucosa intestinal, para explicar la variación en los síntomas de intolerancia experimentados por los malabsorbentes a la lactosa. Los resultados de los estudios no cruzados, sin tomar en consideración las variables intra-individuales, pueden ser sesgados si se ignora la actividad residual del enzima de la mucosa intestinal. Además, otro factor que puede producir sesgos serían las dosis diferentes de enzima. De hecho, se conoce que existe una relación estrecha entre la cantidad de lactosa para hidrolizar y las unidades de enzima que se necesitan (Rosado-1984, Lin-1993). Es más, el pH del estómago y las concentraciones de sales biliares pueden influenciar la eficacia de la lactasa exógena.

Preparados sólidos de lactasa, en cápsulas y tabletas, son alternativas comerciales disponibles para la terapia de re-emplazamiento enzimático (DiPalma-1989, Biller-1987). No obstante, estudios comparativos demostraron que estos preparados son más caros y significativamente menos efectivos que la leche pre-hidrolizada, probablemente debido a la inactivación producida por los enzimas gástricos (Suarez-1995b, Onwulata-1989). Su uso se puede sugerir para productos lácteos sólidos.

El cumplimiento terapéutico con β -galactosidasa es asegurado por una buena palatabilidad (Nielsen-1984, Barillas-1987, Montalto-2005), aunque hay algunas alteraciones del sabor (Suarez-1995a). Se ha confirmado la seguridad de los preparados de lactasa (Suarez-1995b). En conclusión, la adición de la lactasa exógena, especialmente durante las comidas, parece ser efectiva y prácticamente sin efectos secundarios.

1.2.10.2.2. El yogur y los probióticos

Es bien conocido que los productos de leche fermentada mejoran la digestión de la lactosa y los síntomas de intolerancia en los malabsorbentes a la lactosa (Onwulata-1989, Hove-1999, Adolfsson-2004). Onwulata *et al.* (1989) demostraron que el yogur simple disponible comercialmente es tan efectivo en reducir el H₂ y los síntomas como la leche pre-hidrolizada. El uso de la leche fermentada se basa en la presencia de la actividad de la lactasa endógena de los microorganismos del yogur. El yogur se prepara de la leche incubada principalmente con dos especies de bacterias de ácido láctico, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (Bourlioux-1988, Adolfsson-2004). Estos microorganismos participan en la hidrólisis de la lactosa durante el proceso de fermentación y después de ingesta de lactosa (Kolars-1984, Gorbach-1990). Se ha calculado que la fermentación disminuye el contenido de lactosa cerca de aproximadamente 25-50% (McDonough-1987, Gorbach-1990). Al mismo tiempo, este proceso resulta en un sabor ácido y sólo por culpa de esta acritud, hay muchos sujetos que no quieren el yogur.

Para superar este límite, se ha propuesto, como alternativa, la adición de concentraciones altas de *L. acidophilus* viable en leche fría, obteniendo una leche no-fermentada (leche dulce con acidophilus) (Onwulata-1989, McDonough-1987, Savaiano-1984). Para explicar estos hallazgos, se ha propuesto que la lactasa bacteriana en la leche dulce con acidophilus es insuficiente para mostrar un efecto medible o no es fácilmente disponible en la luz intestinal, siendo accesible sólo si aparece la ruptura de la membrana celular (Hove-1999, McDonough-1987). De hecho, las estructuras de ácido láctico de la membrana celular de la bacteria tienen un papel llave en la disponibilidad de la β -galactosidasa (Onwulata-1989, Mustapha-1997).

Lin et al (1998) compararon *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, dos bacterias termofílicas con actividad similar de β -galactosidasa, la misma sensibilidad biliar y el mismo transporte activo para la lactosa, pero que difieren en la resistencia de las estructuras de la pared de la membrana celular. Midiendo la excreción de H₂ espirado y la escala clínica, ellos encontraron que el *L. bulgaricus* es una opción mejor para la producción de productos de la leche fermentada, porque las estructuras de la membrana de la pared celular de *L. bulgaricus* son menos duras que aquellas de *L. acidophilus*, con una habilidad consecutiva mejor de liberar el enzima.

Para liberar efectivamente la β -galactosidasa, la bacteria necesita una pared celular intacta como protección mecánica del enzima durante el pasaje gástrico y para protegerlo de la acción de las sales biliares (de Vrese-2001). Se demostró que el ácido gástrico degradaba la actividad de la lactasa bacteriana en 20-60 min (Lerebours-1989). No obstante, la asociación de

L. acidophilus BG2F04 con omeprazol no resulta en una producción reducida de hidrógeno y los síntomas gastrointestinales no mejoraron después de la ingesta de lactosa con respecto a los lactobacilus sin el omeprazol (Saltzman-1999). Estos resultados podrían haberse debido a la selección de la bacteria láctica. De hecho, es bien conocido que los lactobacilus se comportan diferentemente, dependiendo de las especies (Szilagyi-1999, Sherman-2004). Así como se ha demostrado recientemente, la administración del producto multiprobiótico VSL3 no ha reducido la excreción de H₂ ni el *score* clínico (Yesovitch-2004). Se necesitan investigaciones suplementarias para clarificar el papel de los probióticos en la terapia de la intolerancia de la lactosa, tomando también en consideración sus efectos benéficos bien conocidos sobre las funciones intestinales, el metabolismo del gas y la motilidad (de Vrese-2001).

La actividad bacteriana de β -galactosidasa del yogur se considera como el factor principal responsable de mejorar la digestión de la lactosa; su osmolaridad más grande y la densidad de la energía también podría jugar un papel (de Vrese-2001). El yogur alarga el vaciamiento gástrico y el tránsito intestinal, produciendo una liberación más lenta de la lactosa en el intestino, optimizando así la acción de la β -galactosidasa residual en el intestino delgado y disminuyendo la carga osmótica de lactosa (de Vrese-2001, Gilat-1972).

MATERIAL Y MÉTODO

2. MATERIAL

En el período 2004-2005 se ha estudiado una muestra de 135 niños, seleccionada de una muestra mayor, de 362 niños, aleatorizada, que acudieron consecutivamente a la Consulta de Nutrición y Metabolismo Pediátrico, con sospecha de malabsorción de lactosa. Esta muestra inicial fue estudiada previamente con el motivo del Trabajo de Investigación Tutelado (2003), titulado: “Sintomatología gastrointestinal sugerente de malabsorción a la lactosa en los niños. Confirmación mediante BH₂T”.

2.1. Muestra de 362 niños estudiada en el año 2003

2.1.1. Distribución de la muestra del 2003 según el sexo y de la edad

En la muestra inicial, estudiada en el año 2003 y compuesta por 152 varones (42,1%) y 210 mujeres (57,9%), con un rango de edad entre 2-18 años, se incluyeron niños con sospecha de malabsorción a la lactosa y que acudieron a la consulta por síntomas gastrointestinales.

2.1.2. Distribución de la muestra del 2003 según los motivos de consulta

Los motivos de consulta más frecuentes fueron: dolor abdominal (57,06%), vómitos (10,59%), náuseas (7,06%), flatulencia (4,83%) y otros, algunos pacientes.

2.1.3. Distribución de la muestra del 2003 según el resultado del BH₂T post 2 g lactosa/kg peso (< 50g).

El diagnóstico de malabsorción y de intolerancia a la lactosa se efectuó mediante el test de hidrógeno espirado. Tras la administración de una sobrecarga de lactosa de 2 g/Kg hasta un máximo de 50g, el 24,6% de los niños presentaron malabsorción a la lactosa, 4,4% deficiente absorción y 70,8% absorción a la lactosa (figura 2.1).

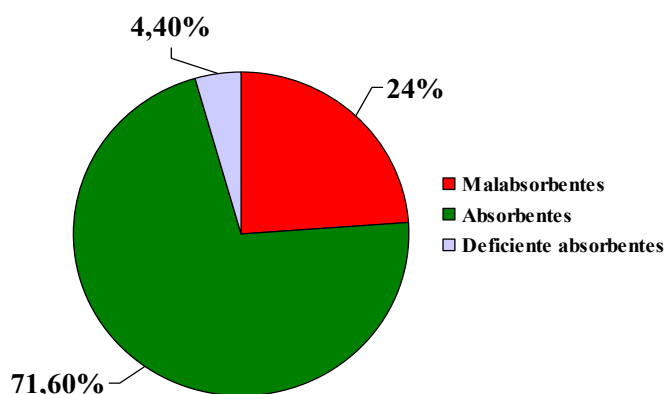


Figura 2.1. La distribución de la muestra del 2003, en función del resultado del BH₂T post 2 g lactosa/kg peso (< 50g).

Del total de 89 niños malabsorbentes a la lactosa, 68,3% han presentado intolerancia a la lactosa y 31,7% tolerancia (figura 2.2).

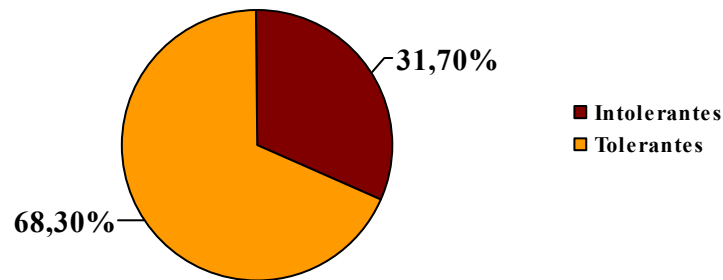


Figura 2.2. La distribución de 89 los niños malabsorbentes de la muestra del 2003, en función de la presencia o la ausencia de síntomas (niños intolerantes y tolerantes, respectivamente), durante el BH₂T post 2 g lactosa/kg peso (< 50 g).

Del total de 252 niños absorbentes a la lactosa, 93,8% fueron tolerantes y 6,2% fueron intolerantes (figura 2.3).

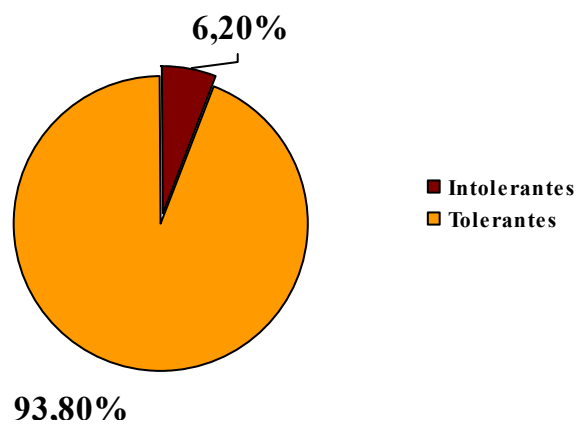


Figura 2.3. La distribución de los niños absorbentes de la muestra del 2003, en función de la presencia o la ausencia de síntomas (niños intolerantes y tolerantes, respectivamente), durante el BH₂T post 2g lactosa/kg peso (< 50 g).

Del total de 362 niños participantes en el primer estudio, 17% fueron malabsorbentes y tolerantes, 8% malabsorbentes e intolerantes, 4% deficientes absorbentes y tolerantes, 4% absorbentes e intolerantes y 67% absorbentes y tolerantes.

2.2. Muestra de 135 niños estudiada en los años 2004-2005.

De los 362 niños, la muestra aleatorizada que se estudió en el año 2003, se ha seleccionado, un año después, un grupo de 135 niños que aceptaron participar en el estudio genético, después de que los familiares, los tutores legales y los niños mismos fueron debidamente informados sobre los objetivos, procedimientos, riesgos y beneficios del estudio y después de haber firmado el consentimiento informado (ver apéndice).

2.2.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el sexo

Del total de 135 niños que aceptaron participar en el estudio, 41,5% eran varones (56 niños) y 58,5% mujeres (71 niñas).

2.2.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según la edad

Del total de 135 niños participantes en el estudio, 13,3% tenían menos de 7 años y 8,8% más de 14 años. El rango de edad estaba entre 2 y 18 años. En la tabla 2.1 se indica la clasificación por grupos de edad de la muestra seleccionada en el período 2004-2005.

Tabla 2.1. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función de la edad.

Grupo de edad	Nº niños	% niños
< 7 años	18	13,3
7 años	13	9,6
8 años	18	13,3
9 años	9	6,7
10 años	10	7,4
11 años	15	11,1
12 años	12	8,9
13 años	11	8,1
14 años	17	12,6
> 14 años	12	8,8

2.2.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el motivo de la consulta

Se estudiaron un total de 135 pacientes que se presentaron en la consulta por los siguientes motivos: la mayoría de ellos por dolor abdominal (54,8%), 14,1% por diarrea, 17,8% por náusea, 14,1% por vómitos y 9,6% por cefalea, como motivo principal de la consulta (figura 2.4).

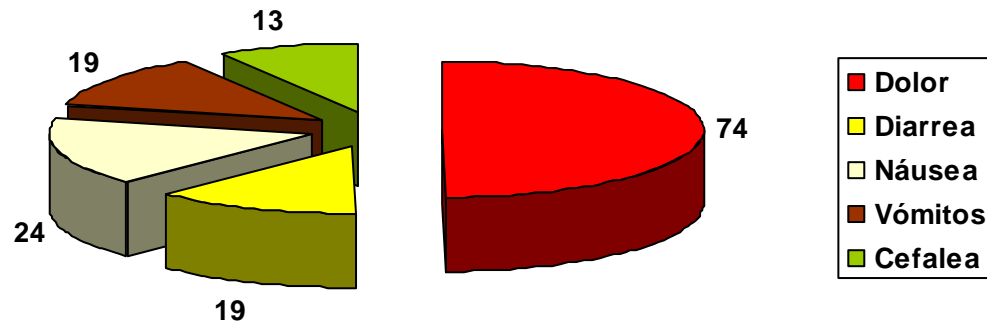


Figura 2.4. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función del motivo de consulta

2.2.4. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el fenotipo obtenido en el BH₂T

Del total de 135 niños participantes en el estudio, la mayoría de 63,7% han sido malabsorbentes (86 niños), 29,6% absorbentes (40 niños) y 6,6% deficientes absorbentes (9 niños) (tabla 2.2 y figura 2.6).

Tabla 2.2. La distribución de la de la muestra del 2004-2005 en función de los fenotipos obtenidos después del BH₂T

Fenotipo	Nº Niños	% Niños
Malabsorción	86	63,7
Deficiente absorción	9	6,6
Absorción	40	29,6

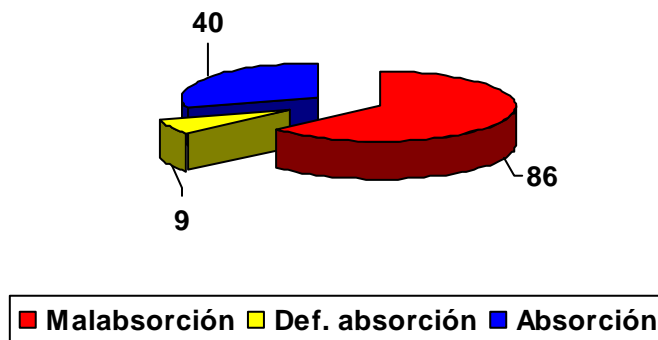


Figura 2.5. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función de los fenotipos obtenidos después del BH₂T

Tomando en consideración la presencia o la ausencia de síntomas durante el BH₂T, los 135 niños participantes en el estudio se clasificaron en: malabsorbentes e intolerantes-43,7%, malabsorbentes y tolerantes-20%, deficiente absorbentes e intolerantes-0,7%, deficiente absorbentes y tolerantes-5,9%, absorbentes e intolerantes-7,4% y absorbentes y tolerantes-22,2% (tabla 2.3).

Tabla 2.3. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función de los fenotipos obtenidos en del BH₂T y de la presencia de síntomas en el BH₂T

Fenotipo	N° Niños	% Niños
Malabsorción e intolerancia	59	43,7
Malabsorción y tolerancia	27	20
Deficiente absorción e intolerancia	1	0,7
Deficiente absorción y tolerancia	8	5,9
Absorción e intolerancia	10	7,4
Absorción y tolerancia	30	22,2

2.2.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los síntomas presentados durante el BH₂T

Del total de 135 niños participantes en el estudio, la mayoría presentaron dolor abdominal durante la prueba de BH₂T (49,6%), 13,3% diarrea, 10,4% náusea, 0,7% vómitos y 5,2% cefalea (figura 2.6).

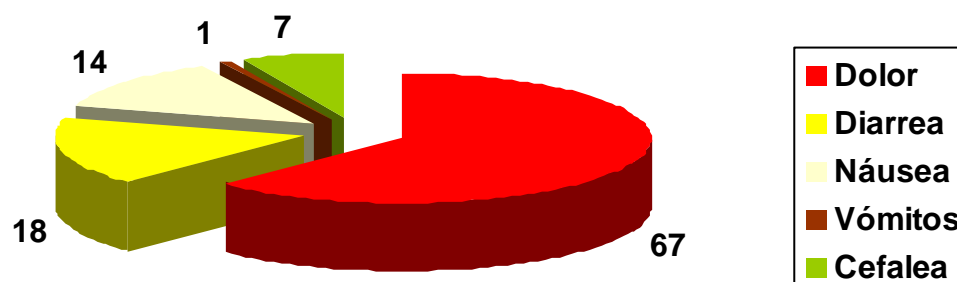


Figura 2.6. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función de los síntomas presentados durante el BH₂T.

2.2.6. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los motivos de consulta y los síntomas presentados durante el BH₂T.

Como se observa en la tabla 2.4 y la figura 2.7, los niños presentaron durante el BH₂T los mismos síntomas que causaron sus consultas. El síntoma predominante fue el dolor abdominal (49,6% de los niños lo acusaban como motivo de consulta y 54,8% de los niños lo presentaron durante el BH₂T), seguido de diarrea (13,3% y 14,1%, respectivamente), náuseas (10,4% frente a 17,8%), cefalea (5,2% frente a 9,6%) y vómitos (0,7% frente a 14,1%). La proporción de síntomas presentados durante el BH₂T superó la proporción de síntomas por las cuales los niños se presentaron en la consulta de Nutrición Pediátrica.

Tabla 2.4. La distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 en función de los motivos de consulta y de la presencia de síntomas durante el BH₂T.

Síntomas	Motivos de consulta		Síntomas durante BH ₂ T	
	Nº	% niños	Nº	% niños
Dolor abdominal	67	49,6	74	54,8
Diarrea	18	13,3	19	14,1
Náusea	14	10,4	24	17,8
Cefalea	7	5,2	13	9,6
Vómitos	1	0,7	19	14,1

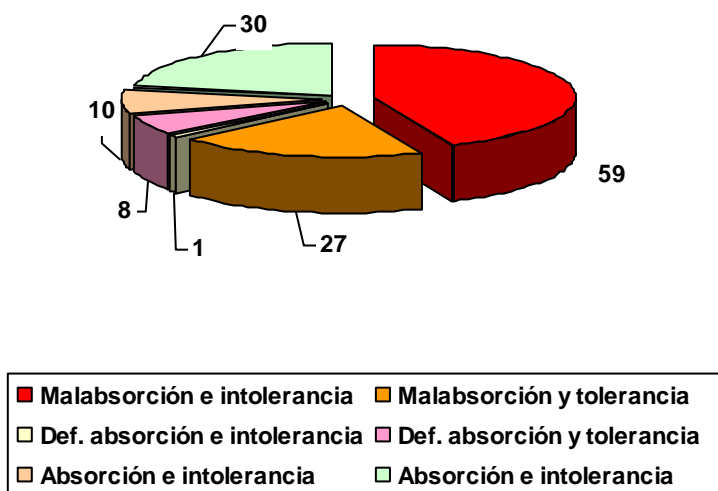


Figura 2.7. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función de los fenotipos obtenidos después del BH₂T y de la presencia de síntomas durante el BH₂T.

2.2.7. Distribución de los fenotipos obtenidos por el BH₂T, de la muestra del período 2004-2005, según la edad

En la tabla 2.5 se observa que en el grupo de edad de 2-5 años no se encontró ningún niño malabsorbente. Sin embargo, a partir de los 6 años de edad, la mayoría de los niños fueron malabsorbentes.

Tabla 2.5. La distribución de los fenotipos obtenidos por el BH₂T, de la muestra del período 2004-2005, según la edad

Edad (años)	Malabsorción	Def. absorción	Absorción
2	0	0	1
3	0	0	3
4	0	1	2
5	0	0	4
6	5	1	2
7	15	0	7
8	13	1	4
9	7	0	2
10	6	1	3
11	10	0	5
12	11	0	1
13	9	2	0
14	11	3	3
15	4	0	1
16	4	0	1
17	1	0	0
19	0	1	1
Total	86	9	40

2.3. Controles gallegos

Grupo formado por 81 muestras de ADN, de población general gallega (cuatro abuelos gallegos), procedentes del banco de ADN de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, compuesto de donantes sanos voluntarios que dieron su consentimiento para realizar análisis genéticos y moleculares con fines de investigación.

2.4. Controles de otras nacionalidades

Grupo formado por muestras procedentes del Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela y correspondientes a individuos anónimos, procedentes de Noruega, Grecia, Mozambique y Taiwán. Se desconocía el fenotipo para la malabsorción a la lactosa, pero se sabía que los individuos eran representativos de la población general de estos países. La muestra de origen noruego estaba compuesta por 45 individuos procedentes del área de Oslo y se ha comparado con la muestra de origen griego, compuesta por 44 individuos del área de Atenas. La muestra de origen taiwanés estaba compuesta por 55 individuos del área de Taipei y se ha comparado con una muestra compuesta por 57 individuos de diferentes áreas de Mozambique.

3. MÉTODO

Se ha informado a todos los pacientes y a sus familiares (o tutores legales) que acompañaban a los niños, sobre la metodología utilizada en el presente estudio de investigación y sobre sus implicaciones y sus repercusiones en el estado de salud de los pacientes. Se han respetado las normas éticas de investigación en los menores de edad y antes de empezar el estudio en cada niño se ha firmado el consentimiento informado por parte del familiar o tutor legal acompañante y también por parte de los niños, en el caso de los menores mayores de 14 años.

Se ha utilizado un protocolo de investigación que cumple los requisitos exigidos por el Comité de Bioética local.

3.2.1. Historia clínica tratando de resaltar los síntomas sugerentes de malabsorción a la lactosa.

3.2.1.1. Los antecedentes personales del paciente:

A) Fisiológicas: peso al nacer, *score* Apgar, tipo de parto, nacido a término o prematuro, consumo de leche durante el embarazo, meses de lactancia materna, en los que no recibían leche materna, preparados de leche artificial.

B) Patológicas: las enfermedades que presentó el niño, con acento sobre la patología gastro-intestinal (hospitalizaciones: diagnóstico y duración, síntomas que presenta el niño si no puede tolerar la leche y si fue diagnosticado previamente de malabsorción a la lactosa, la evolución y la dieta actual).

3.2.1.2. Los antecedentes heredo-colaterales: los miembros de la familia que no toleran la leche, miembros de la familia diagnosticados de malabsorción a la leche, las enfermedades gastrointestinales y las alergias en la familia).

3.2.2. Estudio antropométrico: peso, talla, índice de masa corporal, circunferencia brazo (cm), circunferencia muñeca (cm), circunferencia cintura (cm), circunferencia cadera (cm), pliegue bicipital (mm), pliegue tricípital (mm), pliegue subescapular (mm), pliegue suprailíaco (mm).

3.2.3. Encuesta alimentaria sobre los hábitos y la frecuencia de consumo de productos lácteos en la familia.

3.2.4. Test de hidrógeno espirado

3.2.4.1. Justificación del test

Se basa en la medición de la concentración de hidrógeno (H_2) en el aire espirado después de la administración de una cantidad significativa de lactosa. El hidrógeno es producido por las bacterias de la flora intestinal, coliformes o anaerobias (Levitt-1969, Robb-1985), como resultado del catabolismo de alimentos que alcanzan el colon, sobre todo carbohidratos, ya que el hidrógeno generado a partir de aminoácidos es muy escaso (Rerat-1983). Dado que no existe producción de este por las células de los mamíferos, su presencia en el aire espirado puede interpretarse como indicador de la existencia de azúcares a nivel colónico.

En ocasiones, se pueden encontrar concentraciones bajas de hidrógeno en la espiración incluso después de varias horas de ayuno, producidas por el catabolismo de glicoproteínas de la luz intestinal. Esto podría suponer una media de 35 ml/día (Newcomer-1984), pero la ratio de

correlación entre el H₂ espirado y el producido en el colon es buena ($r=0,949$), por lo que será un buen indicador de malabsorción intestinal de azúcares (Levitt-1969).

Levitt demostró en 1969 que un 14% del gas producido en el intestino grueso era absorbido, alcanzando el corazón derecho a través de la vena porta y siendo expulsado por los pulmones en la respiración (Levitt-1969, Calloway-1968). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la cantidad de hidrógeno en el aire espirado no sólo dependía de su producción, sino también de la reutilización por parte de otras bacterias integrantes de la flora intestinal, por lo que las personas consideradas tradicionalmente no productoras, podrían ser aquellas cuyas bacterias colónicas fueran capaces de reutilizar el H₂. De este modo, el H₂ no sería absorbido y eliminado por los pulmones (Newcomer-1984).

También en 1969, Calloway describió el primer método para determinar la malabsorción de lactosa a partir del H₂ espirado (Calloway-1969), que consistía en su determinación después de una noche en ayunas y en determinaciones en intervalos de 30 minutos, durante 5 horas, tras la administración de 10 g de leche líquida/kg peso (0,5 g lactosa/kg peso). La recogida del aire espirado se hacía en unas jeringuillas de plástico o bolsas herméticas y la medición de H₂ con el cromatógrafo de gases. Este método demostró ser sensible para medir la malabsorción de pequeñas cantidades de lactosa, del orden de 2-5 g (Levitt-1969).

El test del hidrógeno espirado (BH₂T) es considerado un método cualitativo por algunos autores y semicualitativo por otros. Mide la tolerancia funcional a la lactosa in vivo, por lo que puede detectar mejor la malabsorción del azúcar que los llamados métodos directos (biopsia intestinal), ya que ésta sólo mide la actividad láctasica en una localización particular (Barr-1981).

Hasta ahora es el test más ampliamente difundido, reconociéndosele la mayor sensibilidad y especificidad de todos los métodos utilizados previamente, además de su sencillez metodológica y analítica y su no invasividad. Sin embargo, existen diversos factores que pueden falsear los resultados del test:

3.2.4.2. Factores que originan falsos negativos:

1. El uso de fármacos

Los enemas y laxantes disminuyen la producción de hidrógeno en el colon al alterar su flora bacteriana (Gilat-1978), al igual que los antibióticos.

2. Flora bacteriana productora de hidrógeno

En algunos individuos, la flora bacteriana capaz de producir hidrógeno tras la fermentación de los azúcares está disminuida, pudiendo ser causa de concentraciones bajas del gas en el aire espirado, aún cuando la malabsorción está presente.

Para descartar a estas personas, se realiza la prueba tras la administración de lactulosa, azúcar que no se absorbe en el intestino humano y es metabolizado en el colon, dando lugar a un incremento de hidrógeno. Si esto no sucede así, es indicativo de la ausencia de la flora productora (Gilat-1978, Metz-1976, Dowes-1985). Se ha observado que entre un 2 y un 20% de personas no son productoras de hidrógeno. (Gilat-1978, Arola-1988, Ostrander-1983, Sategna-Guidetti-1989). Sin embargo, Newcomer no encontró ninguna persona no productora de hidrógeno (Newcomer-1975), ya que sostiene que la falta de hidrógeno se debe a la reutilización de éste por las otras bacterias (Newcomer-1984).

También se sabe que en algunas personas su flora bacteriana utiliza el hidrógeno y produce metano, que puede ser eliminado por flatulencias o por el aire espirado, con lo que las personas productoras de metano podrían tener un hidrógeno en el aire espirado falsamente disminuido (Bjorneklett-1982, Perman-1981, Flatz-1985).

3. pH colónico

Se ha demostrado en estudios recientes que el hidrógeno producido por las bacterias colónicas se ve disminuido en un 24%, cuando el pH desciende de 7 a 5,5; y se incrementa rápidamente al alcalinizar el contenido intestinal con sulfato de magnesio (Perman-1981, Ostrander-1983). Esto explicaría los falsos negativos en los malabsorbentes a la lactosa con diarrea crónica por persistir con la ingesta del azúcar y en gastroenteritis agudas, aún cuando hay un cuadro transitorio o primario de malabsorción de lactosa.

4. Hiperventilación o llanto

Si la recogida de muestra se realiza en estas circunstancias, se puede diluir el aire espiratorio final (aire alveolar) con aire del espacio muerto, disminuyendo la concentración de hidrógeno. Esto se corrige midiendo la concentración de CO₂ y normalizando la de H₂ según ésta. Existen ya cromatógrafos que miden simultáneamente ambos parámetros (Niu-1979).

3.2.4.3. Factores que originan falsos positivos

1. Fumar

Debido al contenido de hidrógeno del humo de tabaco, si se fuma durante la prueba, se puede producir un falso incremento en su concentración (Tadesse-1977, Rosenthal-1980).

2. El sueño

Durante el sueño se producen dos fenómenos que pueden inducir a un aumento de la concentración de hidrógeno en el aire espirado. Por un lado, la hipoventilación y por otro, el vaciado intermitente del intestino durante el sueño y la hipomotilidad del colon, que dará lugar a un mayor tiempo de fermentación (Solomons-1976).

3. Sobrecrecimiento bacteriano

El sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado puede incrementar el hidrógeno espirado, a costa del producido por la fermentación de glicoproteínas endógenas (Perman-1984). También una pobre higiene bucal, que resultaría en un sobrecrecimiento a este nivel, puede producir incrementos de H₂ por metabolización de azúcares retenidos en ésta, aunque éstos serán leves y transitorios y no alterarían el resultado del test (Thompson-1985).

4. Dieta

Alimentos ricos en carbohidratos no absorbibles, como coles, judías, pimientos, melón, sandía, maíz etc., ingeridos la noche anterior, pueden lugar a altas concentraciones basales de hidrógeno espirado (Perman-1984).

5. Velocidad de vaciado gástrico

Una velocidad de vaciado gástrico muy rápida podría saturar un intestino normolactásico, produciendo incremento en el hidrógeno espirado, mientras que una velocidad lenta podría hacer llegar al intestino cantidades de lactosa que fuesen perfectamente toleradas, aunque la actividad lactásica estuviese reducida (Welsh-1977).

6. Ingesta de salicilatos

La aspirina puede incrementar el hidrógeno espirado por un mecanismo no muy bien conocido hasta el momento, aunque se piensa que podría deberse a un enlentecimiento de la motilidad del intestino grueso, por una disminución en la concentración de prostaglandinas (Flatz-1982).

Esta técnica ampliamente utilizada en los últimos años ha sufrido múltiples cambios por diversos grupos de investigación. Se han modificado las dosis y la forma de administración de la lactosa, buscando situaciones más fisiológicas; el tiempo y el intervalo de la recogida de muestras, desde monitorización continua, hasta tomas intermitentes con diferentes intervalos; el método de recogida (mascarillas, cánulas, gafas nasales, jeringuillas plásticas, bolsas herméticas etc.); y el incremento de hidrógeno a considerar para diagnosticar la malabsorción de lactosa también fue sometido a debate.

El test de hidrógeno espirado es un método no invasivo que mide la capacidad intestinal para digerir la lactosa y se utiliza para diagnosticar la deficiencia de la lactasa. Consiste en la medición del hidrógeno en el aire espirado después de una noche de ayuno y post-administración de una dosis de lactosa, ya sea el disacárido en solución acuosa, en forma de leche o de yogur.

La determinación de los incrementos de hidrógeno en la respiración, posteriores a la ingesta, se realizaron durante un período de tiempo, en intervalos de 30 min. (0 min., 30 min., 60 min., 90 min., 120 min., 150 min., 180 min., 210 min.). Para evitar la alteración de los resultados de BH₂T, se establecieron una serie de requisitos previos: ayuno de 12 horas antes de la prueba, no haber dormido ni realizado ejercicio físico vigoroso una hora antes de la prueba,

no haber tomado antibióticos ni laxantes al menos en los últimos 15 días, ni haber administrado otro fármaco el día de la prueba.

Se recogieron los síntomas referidos durante la prueba desde la sobrecarga con lactosa hasta los 210 minutos, momento en el que se finaliza la prueba. Con la lectura de las concentraciones de hidrógeno en las distintas muestras y la presencia o no de sintomatología gastrointestinal, se estableció el diagnóstico.

3.2.4.4. Preparación antes del procedimiento

Las explicaciones acerca del procedimiento se deben limitar a 5-10 min., en función de la edad del niño. Los niños pequeños tienen un período de atención corto, los niños de edad escolar tienen un buen concepto del tiempo, lo que le permite la preparación previa al procedimiento. Mientras mayor sea el niño, más temprano se puede empezar a prepararlo.

Hay algunas pautas generales para preparar un niño para el test:

- Explicar el procedimiento en términos que el niño entienda, utilizando terminología concreta y evitando términos abstractos.
- Describir lo que se siente durante el examen lo mejor posible, evitando el uso de palabras que tengan más de un significado.
- Enfatizar los beneficios del procedimiento y todo lo que le puede dar placer al niño posteriormente, como el hecho de sentirse mejor.
- Permitir al niño participar en tareas simples y siempre que sea posible, dejarlo tomar algunas decisiones.
- Los juegos y la comunicación en la tercera persona puede ser una buena manera de demostrar el procedimiento al niño pequeño e identificar sus inquietudes.
- Los niños mayores pueden sentirse mejor con videos donde sus compañeros les explican, demuestran y se someten al mismo procedimiento.

3.2.4.5. Sistema de recogida de muestras para el BH₂T

La recogida de las muestras se realizó con un sistema de bolsa, especialmente diseñado para la obtención y el almacenamiento de las muestras de aire alveolar antes de ser analizadas.

El sistema consiste en una bolsa estanco, impermeable, para la recolección del aire, una bolsa de desecho, una válvula en T y una boquilla. La bolsa de desecho está ensamblada en línea con la boquilla, en el otro extremo de la pieza en T. Esta pieza conecta con la bolsa de almacenaje a través de una válvula plana, que si se abre, el flujo de aire va en la dirección correcta. La válvula plana permitirá el paso de éste a la bolsa de almacenaje, una vez que la bolsa de desecho se llena, pero no su retorno a través de la pieza en T. El vaciado de la muestra

se realiza a través de otra pequeña portilla, sellada con una pieza plástica y ajena al circuito anteriormente descrito.

La obtención de la muestra se realiza después de una respiración profunda, espirando a través de la boquilla. El primer aire va a la bolsa de desecho, que tiene una capacidad de 500 ml y cuando ésta se llena, la presión del aire abre la válvula plana conectada con la pieza en T, permitiendo el almacenaje del último aire espirado en la bolsa impermeable, a partir de la cuál se obtendrá la muestra para la medición de hidrógeno.

3.2.4.6. Sistema de medida de la concentración de hidrógeno

La concentración de hidrógeno en la muestra de aire espirado es medida por un cromatógrafo de gases, el QUINTRON CM2 MICROLYZER, que fue diseñado para su determinación. El detector es un sólido estable para la reducción de gases, con alta sensibilidad para el hidrógeno. Posee una columna externa recambiable que tamiza la muestra, reteniendo otros gases, así como vapor de agua que podrían alterar la lectura. El transportador es el aire atmosférico.

Previamente a la medición se debe calibrar el cromatógrafo con una muestra de aire con concentración de hidrógeno conocida, nosotros empleamos 103 ppm de hidrógeno.

Para la medición de la muestra introducimos 20 ml de aire espirado, llenando el circuito, tras esto pulsamos el interruptor que lo cierra, y el gas es transportado a través del sensor por una bomba interna. La concentración del hidrógeno espirado se registra en un panel digital de medida, el tiempo de análisis es de 20 segundos y el intervalo entre muestras de alrededor de un minuto.

En nuestro estudio realizamos una recogida basal (minuto 0 del test), bajo las condiciones anteriormente citadas, previamente a la administración de lactosa. Después de la toma, recogimos muestras cada 30 minutos durante 3 horas.

3.2.5. Estudios genéticos

A todos los niños evaluados se les tomaron muestras de sangre periférica para continuar la investigación con los estudios genéticos.

3.2.5.1. Extracción de ADN genómico a partir de 300 µL de sangre fresca

1. En un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL se introducen 900 µL de Solución de Lisis de los Hematíes.
2. Se agita el tubo que contiene la muestra de sangre hasta que se mezcle completamente y se añaden al tubo que contiene los 900 µL de la Solución de Lisis de los Glóbulos Rojos 300 µL de la muestra. Se invierte 5-6 veces para que se mezclen bien.

3. Se incuba la mezcla durante 10 min. a temperatura ambiente, invirtiendo 2-3 veces durante la incubación la mezcla para lisar los hematíes.
4. Se centrifuga durante 1 min. a 13000 rotaciones/minuto.
5. Se desecha el sobrenadante, dejando aproximadamente de 10 a 20 μ L de líquido residual (si la sangre ha sido congelada repetimos los pasos 1 al 5 hasta para que el pellet se vea blanco) y se vortea el tubo vigorosamente hasta resuspender el pellet.
6. Se añaden 300 μ L de Solución de Lisis Celular al tubo donde tenemos resuspendidas las células y se pipetea 5-6- veces la solución para lisar las células blancas. Esta solución se podría volver muy viscosa. Si hay grumos después de la mezcla, incubamos esta solución a 37° C hasta que desaparezcan; si después de una hora de incubación los grumos siguen siendo visibles, se añaden 100 μ L más de Solución de Lisis celular.
7. Se añaden 100 μ L de Solución de Precipitación de las Proteínas y se vortea 10-20 segundos vigorosamente. Pequeños grumos de proteínas pueden ser visibles después de vortear.
8. Se centrifuga a 13000 rotaciones/minuto durante 3 minutos.
9. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo conteniendo 300 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclamos por inversión cuidadosamente hasta ver el ovillo de DNA:
10. Se centrifuga a 13000 rotaciones/minuto durante 3 minutos.
11. Se desecha el sobrenadante y se añade 1 volumen (300 μ L) de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se mezcla invirtiendo varias veces para lavar el DNA y las paredes del tubo.
12. Se centrifuga a 13000 rotaciones/minuto a temperatura ambiente durante 3 minutos.
13. Se decanta el etanol o se aspira con ayuda de una pipeta Pasteur y se invierte el tubo sobre papel absorbente. Se deja a secar el pellet al aire de 10 a 15 minutos.
14. Se añaden 100 μ L de Solución de Rehidratación de ADN, incubando a 65° C durante 1 hora, agitando periódicamente dando golpecitos en la tapa del tubo. Alternativamente también se puede rehidratar incubando la solución toda la noche a temperatura ambiente o a 4° C.
15. Se guarda el ADN a 2-8° C.

Partiendo de 300 μ L de sangre fresca el rendimiento obtenido está entre 5-15 μ g de ADN, dependiendo de la cantidad de células blancas presentes en la muestra, ya que varían de una muestra a otra.

3.2.5.2. Determinación de los genotipos

3.2.5.2.1. PCR y secuenciación

A partir del ADN extraído de la sangre periférica se realizó la detección de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018. Para ello se amplificaron mediante PCR dos fragmentos de ADN con los siguientes pares de cebadores:

1.-5' CTGCGCTGGCAATACAGATA 3' y 5'GCAGGGCTCAAAGAACAATC3' para el fragmento que incluye el SNP C/T-13910.

2.-5'TCCTTAAAAACAGCATTCTCAGC 3' y 5'CTCCTGACCTCAGGTGATCC3 para el fragmento que incluye el SNP G/A-22018.

Componentes de la reacción de PCR:

Agua	csp 25 µL
Buffer 10X	2.5 µL
dNTP (5mM total)	4 µL
Cl ₂ Mg (25mM)	1,5 µL
Primer 1(10 µM)	0,75 µL
Primer 2 (10 µM)	0,75 µL
Taq DNA polimerasa	1,25 U
DNA	100-500 ng

Condiciones termociclador:

1 ciclo	
95°	2'
35 ciclos	
95°	30''
58°	30''
72°	30''
2 ciclo	
72°	7'

Tamaño del fragmento 1 amplificado 215 pb.

Tamaño del fragmento 2 amplificado 224 pb.

Los productos de amplificación se purificaron y se secuenciaron por el método del dideoxi.

Una vez que se obtuvieron muestras con los tres genotipos posibles para cada SNP, estas se utilizaron como controles para el genotipado posterior de todas las muestras que se realizó en la plataforma Sequenom, perteneciente al NODO de Santiago de Compostela del Centro Nacional de Genotipado.

3.2.5.2.2. Sequenom

El procedimiento de genotipado en esta plataforma se realiza mediante los siguientes pasos:

1. Amplificación de la región de interés

Tras la extracción de ADN se amplifican 2,5 ng de ADN genómico que contiene el SNP de interés en una reacción de 5µL en placa de 384 pocillos (figura 3.1).

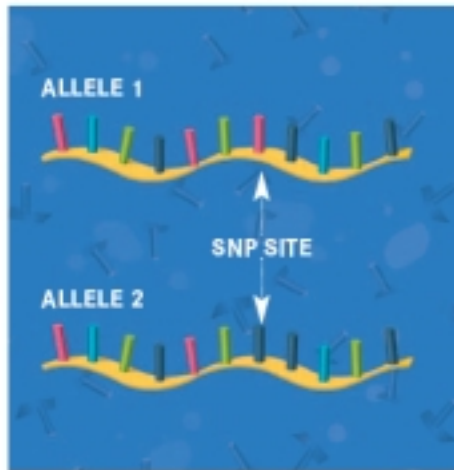


Figura 3.1. La localización del SNP

2. Defosforilación

Se añade fosfatasa alcalina de gamba ártica (SAP) a las muestras para defosforilar cualquier nucleótido residual de la amplificación y para prevenir su futura incorporación e interferencia con el ensayo de extensión de primer.

3. Reacción hME

Se incorporan el primer MassEXTEND, la polimerasa de ADN y una mezcla de dNTPs y ddNTPs para comenzar la reacción de extensión de primer hME. Esta reacción genera productos alelo específicos que son generalmente entre 1 y 4 bases más largos que el primer MassEXTEND original.

3A. Unión del primer

El primer MassEXTEND común que identifica ambos alelos hibrida directamente adyacente o muy próximo al sitio polimórfico (figura 3.2).

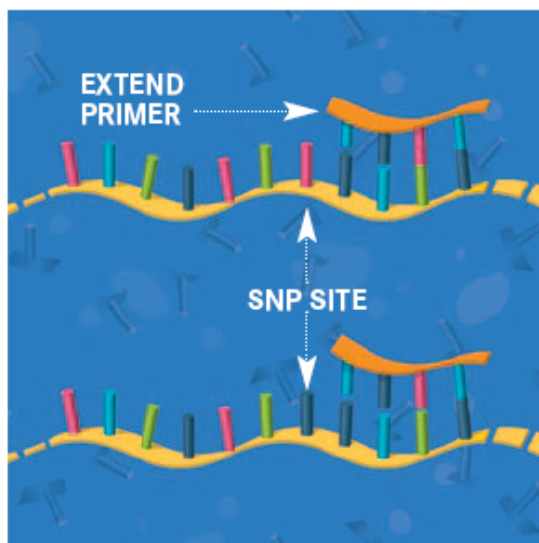


Figura 3.2. Unión del primer

3B. Extensión del primer

Se seleccionan mezclas de oligonucleótidos que maximizan las diferencias de masas entre todos los potenciales productos MassEXTEND. A lo largo del sitio polimórfico se van incorporando los deoxinucleótidos apropiados hasta que es incorporado un dideoxinucleótido y la reacción termina (figura 3.3).

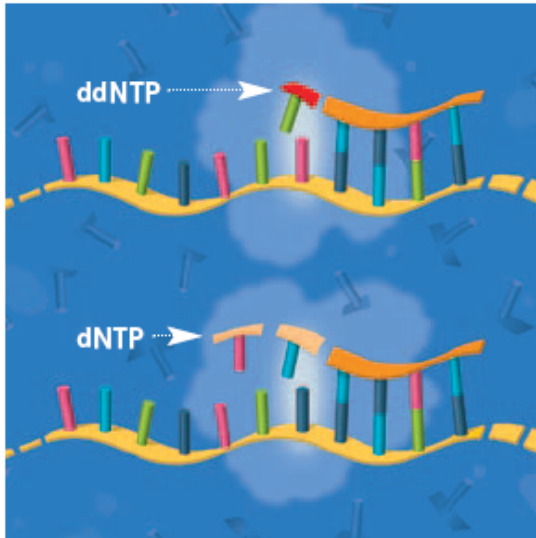


Figura 3.3. Extensión del primer. Se añaden enzima, ddATP, dCTP, dGTP, dTTP

3C. Terminación de la extensión

Tanto el sitio de terminación de la extensión como el número de nucleótidos incorporados son específicos de la secuencia por lo que la masa de los productos de extensión generados puede ser empleada para identificar las posibles variantes sin errores (figuras 3.4 y 3.5).

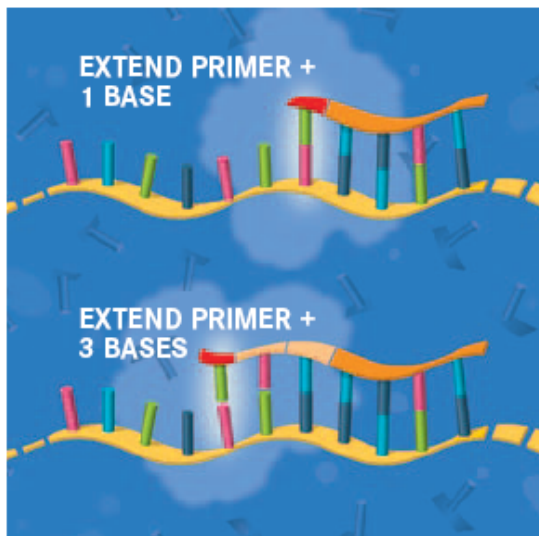


Figura 3.4. Terminación de la extensión

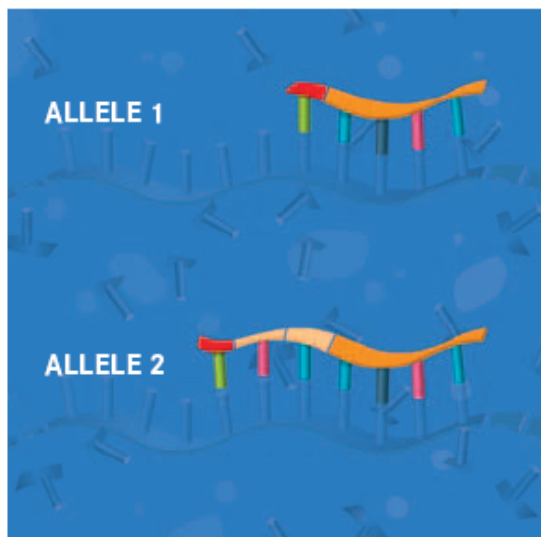


Figura 3.5. Productos de extensión listos para MALDI-TOF.

4. Preparación de la muestra y transferencia

Tras la reacción de extensión se añade la resina de limpieza a la reacción para eliminar las sales externas que pueden interferir en el análisis MALDI-TOF. Se transfieren 15 nl de la muestra desde la placa de 384 pocillos a la superficie del SpectroCHIP® de 384 posiciones (figura 3.6).

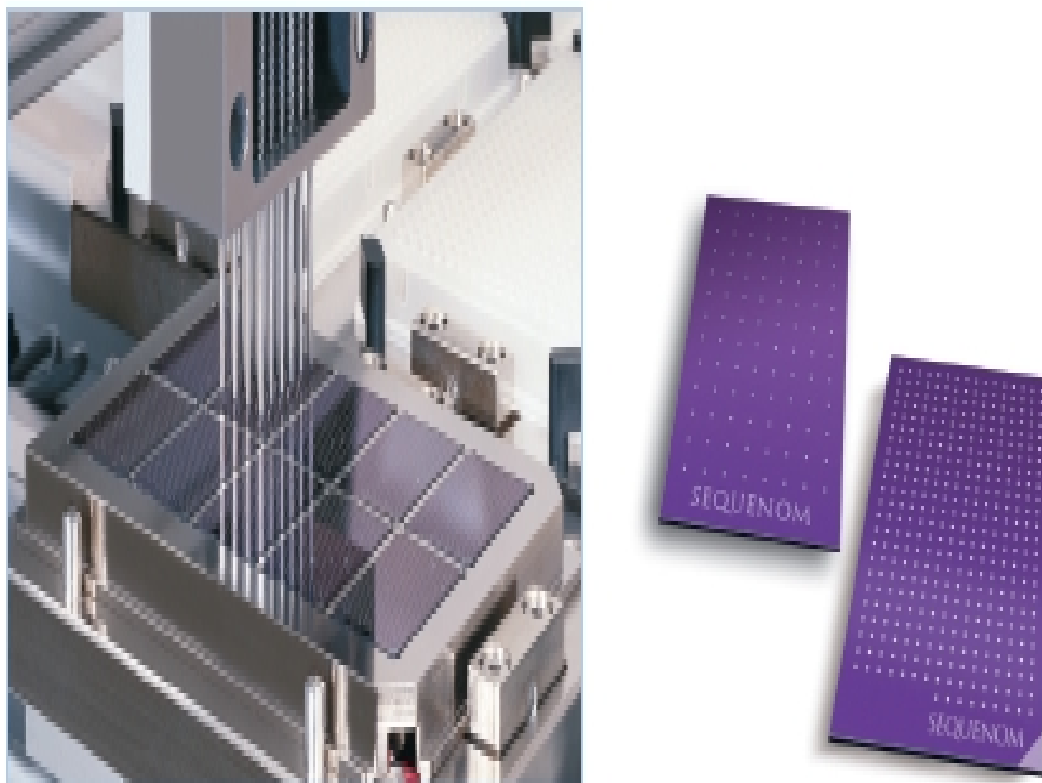


Figura 3.6. Transferencia de productos desde la placa de 384 pocillos al SpectroCHIP®. SpectroCHIP® de 96 y 384 posiciones.

5. Genotipado y bioinformática

El SpectroCHIP se sitúa en el MALDI-TOF y se determina en tiempo real la masa y el correspondiente genotipo con el software MassARRAY RT (Figura 3.7).

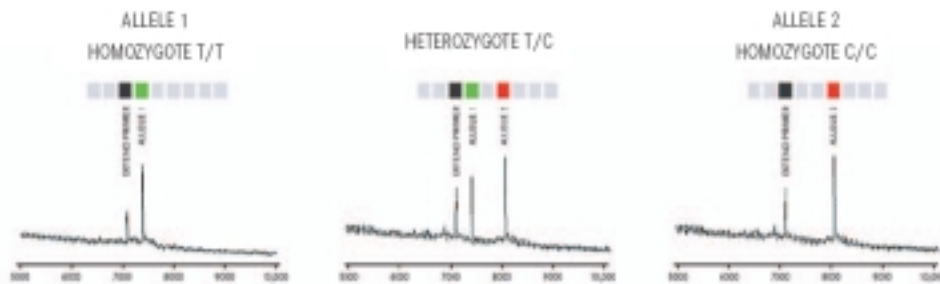


Figura 3.7. Análisis espectral de los productos de la extensión hME. La adición de cada nucleótido al primer incrementa entre 289–329 Daltons la masa, dependiendo del nucleótido añadido. La diferencia de masa se determina fácilmente con el MALDI-TOF que tiene la capacidad de detectar diferencias tan pequeñas como 3 Daltons.

6. Las gráficas obtenidas con la plataforma Sequenom

La figura 3.8 ilustra el histograma representando los dos *SNPs*: C/T-13910 (rs4988235) y G/A-22018 (rs182549). En verde son representados los homocigotos CC y GG, en amarillo los heterocigotos (AG y TC) y en azul los homocigotos AA y TT para cada *SNP*.

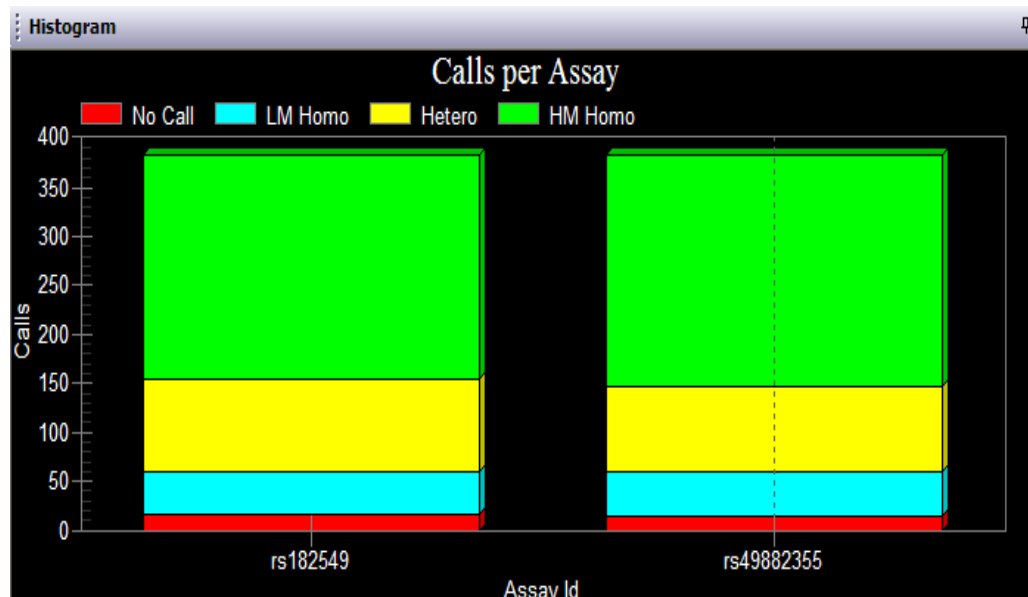


Figura 3.8. El histograma representando los dos *SNPs*: C/T-13910 (rs4988235) y G/A-2201 (rs182549).

La figura 3.9 representa la gráfica Log(Height) para el polimorfismo C/T-13910 (rs4988235). Se observa que los homocigotos TT se agrupan a lo largo del eje de abscisa, los homocigotos CC a lo largo del eje de ordenadas y los heterocigotos son agrupados a lo largo de la diagonal que pasa por el centro de la gráfica.

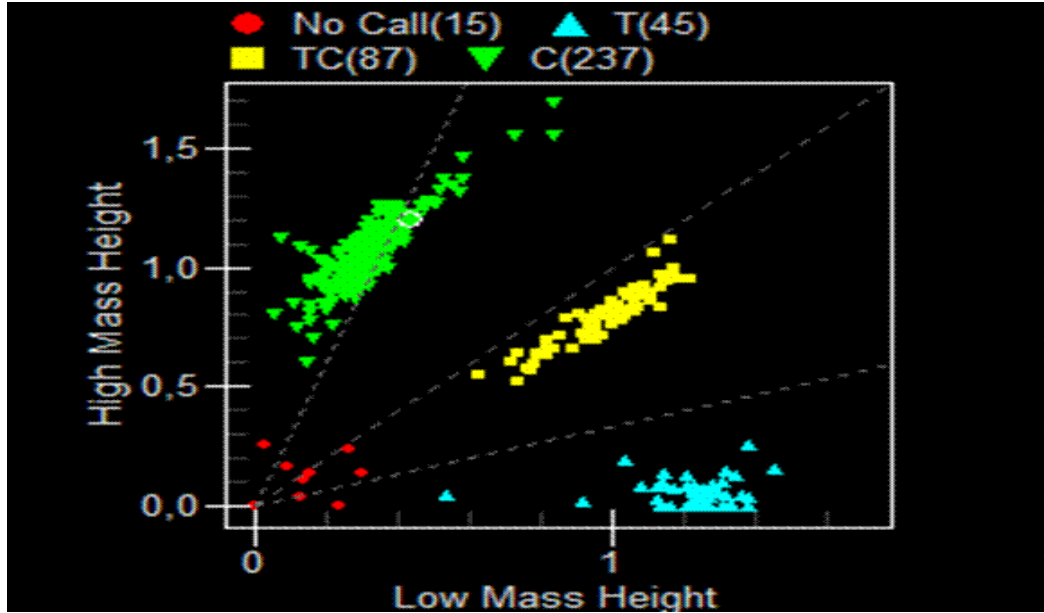


Figura 3.9. La gráfica Log(Height) para el polimorfismo C/T-13910 (rs4988235)

La figura 3.10 representa la gráfica Log(Height) para el polimorfismo G/A-22018 (rs182549). Se observa que los homocigotos se agrupan a lo largo de cada eje y los heterocigotos son agrupados a lo largo de la diagonal que pasa por el centro de la gráfica.

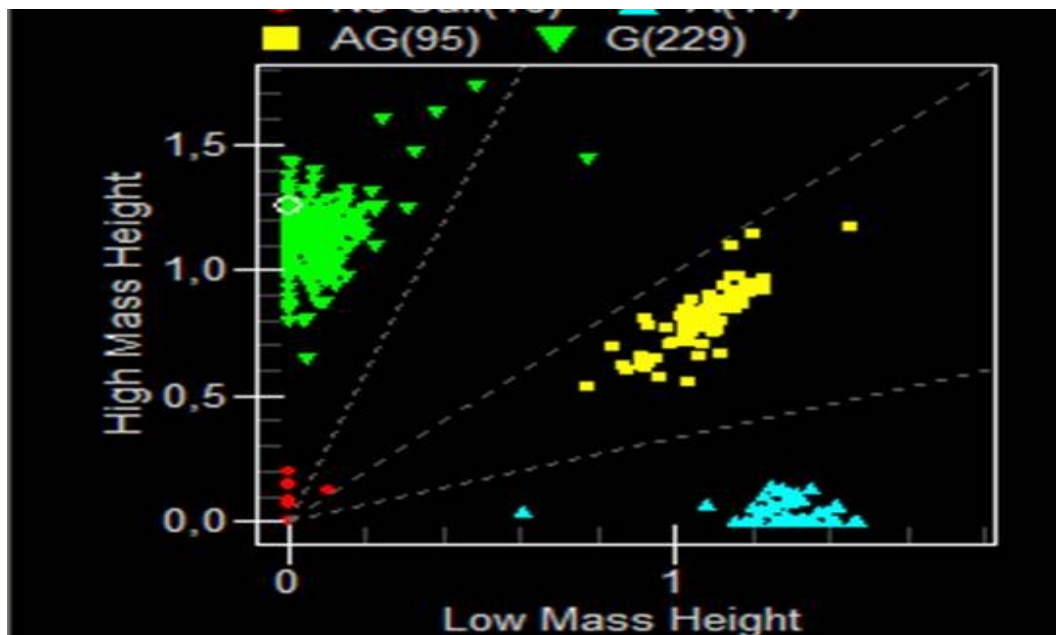


Figura 3.10. La gráfica Log(Height) para el polimorfismo G/A-22018 (rs182549).

En las figuras 3.11, 3.12 y 3.13 se observan los genotipos AG/TC, GG/CC y AA/TT, respectivamente, obtenidos utilizando la plataforma Sequenom.

GENOTIPO AG/TC

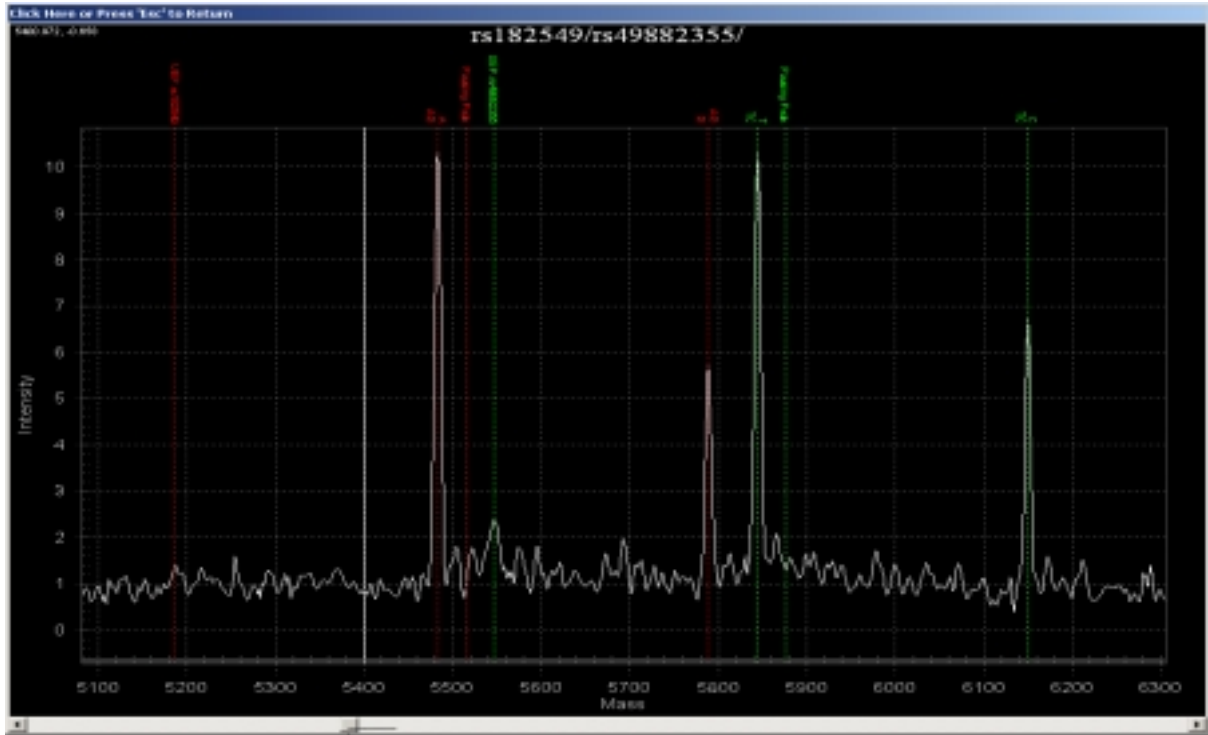


Figura 3.11. Figura representando el genotipo AG/TC.

GENOTIPO CC/GG

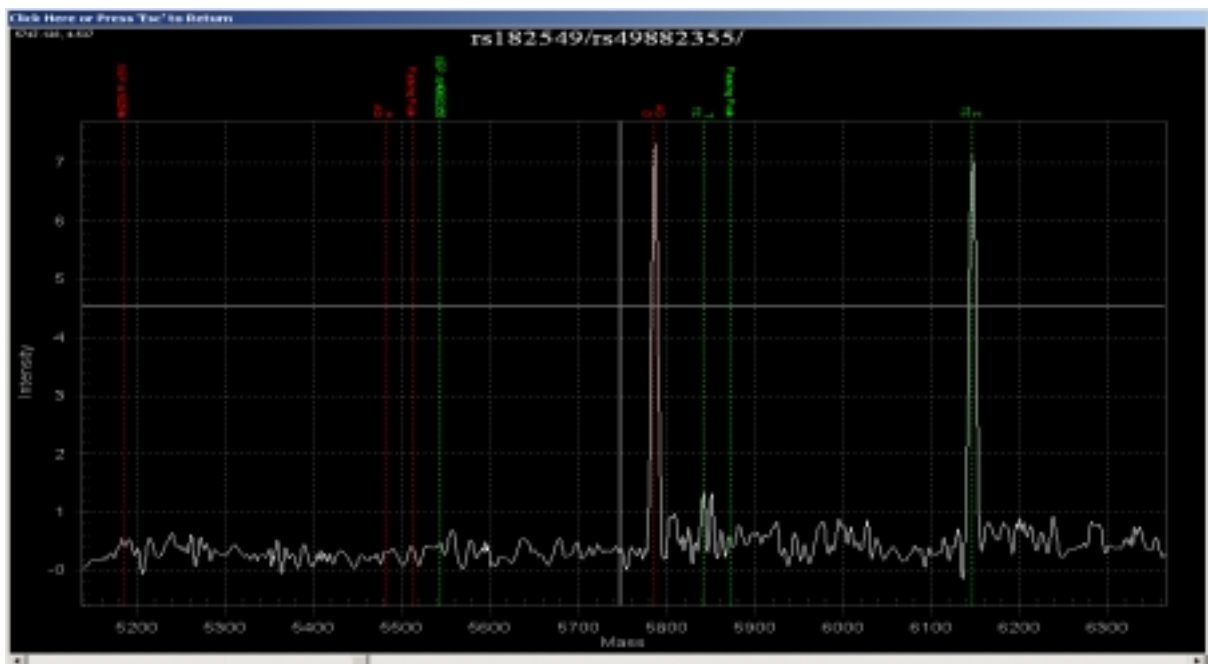


Figura 3.12. Figura representando el genotipo CC/GG.

GENOTIPO AA/TT

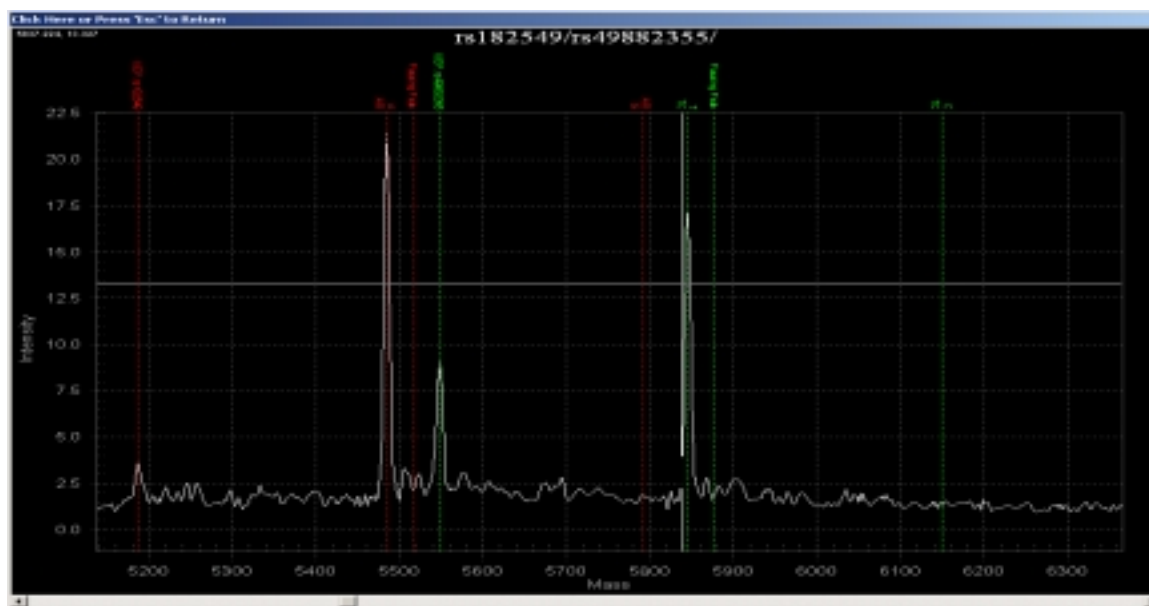


Figura 3.13. Figura representando el genotipo AA/TT.

3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron obtenidos y analizados considerando las recomendaciones del grupo STARD (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*) disponibles en www.consort-statement.org. Para evaluar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las dos variantes de ADN, en comparación con los resultados del BH₂T, se utilizó una tabla de 2x2. Los datos se analizaron utilizando el programa SPSS 12.0.

Definición de los parámetros utilizados para determinar la validez y la fiabilidad de la prueba genética con el SNP C/T-13910 y el SNP G/A-22018.

3.2.6.1. La sensibilidad

Representa la capacidad del test para detectar la enfermedad, es decir la probabilidad de que para un niño malabsorbente se obtenga en la prueba el genotipo GG/CC que es el que consideramos positivo. Calcula la proporción de enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba genética. Si nos referimos solamente al *SNP C/T-13910*, la sensibilidad representa la probabilidad de que para un niño malabsorbente se obtenga el genotipo CC y si nos referimos solamente al *SNP G/A-22018*, es la probabilidad de que para un niño absorbente se obtenga el genotipo GG. (Sensibilidad = verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos negativos)).

3.2.6.2. La especificidad

Representa la capacidad para detectar a los niños sanos, absorbentes, es decir la probabilidad de que para un niño sano se obtenga un resultado negativo (genotipos AA + TT, AG + TC, AG + CC). Si tomamos en consideración solamente el *SNP* C/T-13910, la especificidad representa la probabilidad de que para un niño absorbente se obtengan los genotipos CT o TT y si nos referimos solamente el *SNP* G/A-22018, representa la probabilidad de que para un niño absorbente se obtengan los genotipos GA o AA. (Especificidad = verdaderos positivos / (falsos positivos + verdaderos negativos)).

3.2.6.3. El valor predictivo positivo (VPP)

Representa la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test genético (el polimorfismo GG/CC). Se estima a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba y que finalmente resultaron enfermos. Si tomamos en consideración solamente el *SNP* C/T-13910, el VPP representa la probabilidad de que si se obtiene el genotipo CC, el niño sea malabsorbente. Si nos referimos solamente a la variante G/A-22018, el VPP representa la probabilidad de que si se obtiene el genotipo GG, el niño sea malabsorbente. (VPP = verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos positivos)).

3.2.6.4. El valor predictivo negativo (VPN)

Representa la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba genética (que no tenga el polimorfismo GG/CC) esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba. Si nos referimos solamente al *SNP* C/T-13910, el VPN representa la probabilidad de que si se obtienen los genotipos CT o TT, el niño sea absorbente y si nos referimos solamente al *SNP* G/A-22018, el VPN representa la probabilidad de que si se obtienen los genotipos GA o AA, el niño sea absorbente. (VPN = verdaderos negativos / (falsos negativos + verdaderos negativos)).

3.2.6.5. La razón de verosimilitud (RV)

Representa la probabilidad de un resultado particular en pacientes con la malabsorción a la lactosa, dividida por la probabilidad del mismo resultado en pacientes sin la malabsorción.

RVP = Razón de verosimilitud positiva = (Probabilidad de un resultado positivo en la prueba genética en los pacientes con la malabsorción) / (Probabilidad de un resultado positivo en los pacientes sin la malabsorción).

RVN = Razón de verosimilitud negativa = (Probabilidad de un resultado negativo en la prueba genética en los pacientes con la malabsorción) / (Probabilidad de un resultado negativo en la prueba genética en los pacientes sin la malabsorción).

RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación se refieren a la muestra de 135 niños, estudiados en el período **2004-2005**. Se han analizado el perfil fenotípico de todos estos niños y el perfil genotípico de todos los niños, excepto uno, cuyo ADN no ha resultado de una cualidad suficiente para los análisis posteriores. Este grupo de resultados está seguido del análisis genotípico de los controles gallegos y finalmente, de los controles de otras nacionalidades.

4.1. Muestra de niños del período 2004-2005

4.1.1. Perfil fenotípico de la muestra de niños del período 2004-2005

4.1.1.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y la edad

En la tabla 4.1 se observa que en el grupo de edad de 2-5 años no se encontró ningún niño malabsorbente. Sin embargo, a partir de los 6 años de edad, la mayoría de los niños eran malabsorbentes.

Tabla 4.1. La distribución de la muestra del 2004-2005 en función de la edad y de los fenotipos obtenidos después del BH₂T

Edad (años)	Malabsorción	Def. absorción	Absorción
2	0	0	1
3	0	0	3
4	0	1	2
5	0	0	4
6	5	1	2
7	15	0	7
8	13	1	4
9	7	0	2
10	6	1	3
11	10	0	5
12	11	0	1
13	9	2	0
14	11	3	3
15	4	0	1
16	4	0	1
17	1	0	0
19	0	1	1
Total	86	9	40

4.1.1.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y el sexo

En la muestra seleccionada en el 2004-2005, refiriéndonos a los pacientes malabsorbentes, se encontró una proporción mayor de mujeres que de hombres, 59,32% frente a 40,68% para los intolerantes y 51,85% frente a 48,15% para los tolerantes. El único niño que presentó deficiente absorción e intolerancia fue varón. Del total de 8 niños que presentaron deficiente absorción y tolerancia al test de hidrógeno espirado, la mitad fueron varones y la mitad mujeres.

Los 10 niños que presentaron absorción e intolerancia al test de hidrógeno espirado, se distribuyeron en 2/5 varones y 3/5 mujeres. Una tercera parte de los 30 niños que presentaron absorción e intolerancia al test de hidrógeno espirado fueron varones y 2/3 mujeres (tabla 4.2 y figura 4.1).

Tabla 4.2. La distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y el sexo

Fenotipo	Varones		Mujeres	
	Nº	%	Nº	%
Malabsorción e intolerancia	24	40,68	35	59,32
Malabsorción y tolerancia	13	48,15	14	51,85
Def. absorción e intolerancia	1	100	0	0
Def. absorción y tolerancia	4	50	4	50
Absorción e intolerancia	4	40	6	60
Absorción y tolerancia	10	33,33	20	66,67
Total	56	41,48	79	58,52

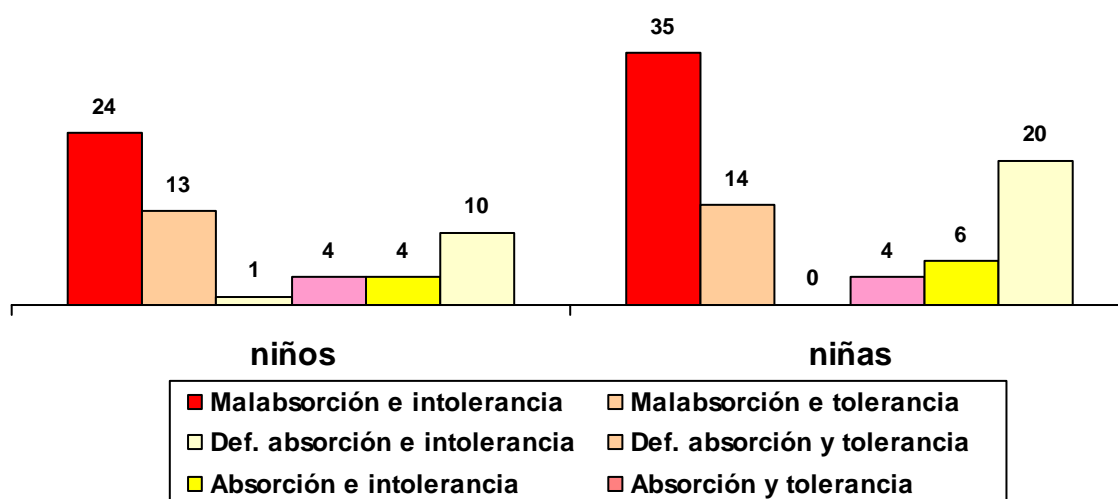


Figura 4.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y el sexo

4.1.1.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por BH₂T y los motivos de consulta

Como se puede observar en la tabla 4.3 y la figura 4.2, la mayoría de los niños cuyo fenotipo en el test de hidrógeno espirado fue de malabsorción e intolerancia, habían consultado por dolor abdominal-50,85% y el resto habían consultado por los siguientes motivos, en orden decreciente: 15,25% por diarrea, 13,56% por náusea, 11,86% por cefalea y 8,47% por vómitos.

Tabla 4.3. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por BH₂T y los motivos de consulta

Fenotipos	Dolor abdominal		Diarrea		Náusea		Vómitos		Cefalea	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción intolerancia	30	50,85	9	15,25	8	13,56	5	8,47	7	11,86
Malabsorción tolerancia	11	40,74	2	7,41	3	1,11	5	18,52	1	1,11
Def. absorción intolerancia	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Def. absorción tolerancia	5	62,5	0	0	1	12,5	1	12,5	1	12,5
Absorción intolerancia	8	80	2	20	5	50	1	10	2	20
Absorción tolerancia	19	63,33	6	20	7	23,33	7	23,33	2	6,06

La distribución de los 27 niños malabsorbentes y tolerantes en función de los motivos de consulta fue parecida: 40,74% por dolor abdominal, 7,41% por diarrea, 18,52% por vómitos y en proporciones iguales de 1,11% por náuseas y cefalea.

El único niño deficiente absorbente e intolerante se presentó a la consulta por dolor abdominal.

La mayoría de los 8 niños deficiente absorbentes y tolerantes se presentaron a la consulta por dolor abdominal (62,5%) y el resto, en proporciones iguales de 12,5%, por náuseas, vómitos y cefalea.

Los 10 niños absorbentes e intolerantes se presentaron a la consulta por los siguientes motivos: 80% por dolor abdominal, 50% por náusea, 20% por diarrea, 20% por cefalea y 10% por vómitos.

Los 30 niños absorbentes y tolerantes se presentaron a la consulta por los siguientes motivos, en orden decreciente: 63,33% por dolor abdominal, 23,33% por náusea, 23,33% por vómitos, 20% por diarrea y 6,06% por cefalea.

Algunos niños se presentaron por más de un motivo a la consulta, pudiendo presentar a la vez dolor abdominal y diarrea o dolor abdominal y náuseas etc. El dolor abdominal fue el motivo de consulta más frecuente.

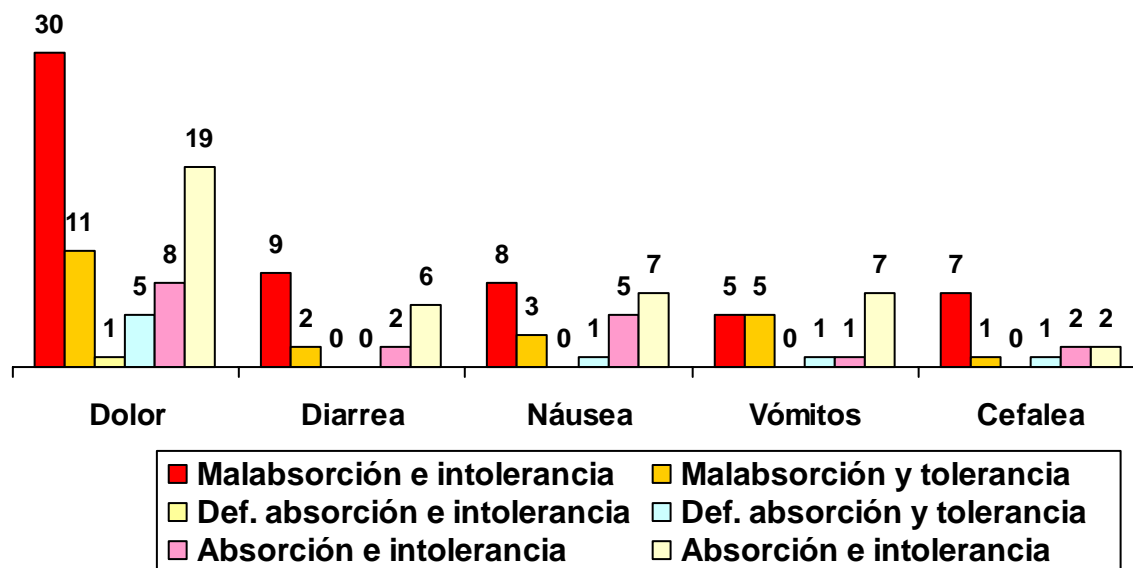


Figura 4.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por BH₂T y los motivos de consulta.

4.1.1.4. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y los síntomas durante el BH₂T

Como se puede observar de la tabla 4.4 y la figura 4.3, la mayoría de los 59 malabsorbentes intolerantes presentaron durante el BH₂T dolor abdominal (94,91%), seguidos en orden decreciente de los siguientes: diarrea (28,81%), náuseas (18,64%), vómitos (1,69%) y cefalea (10,17%).

Tabla 4.4. Distribución de la muestra 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y los síntomas durante el test

Fenotipos	Dolor abdominal		Diarrea		Náusea		Vómitos		Cefalea	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción intolerancia	56	94,91	17	28,81	11	18,64	1	1,69	6	10,17
Def.absorción intolerancia	1	100	0	0	1	100	0	0	0	0
Absorción intolerancia	10	100	1	10	2	20	0	0	1	10

El **único** niño **deficiente absorbente e intolerante** presentó dolor abdominal y náusea como síntomas durante la prueba.

Los **10** niños **absorbentes e intolerantes** presentaron los siguientes síntomas durante la prueba de BH₂T: dolor abdominal (100%), diarrea (10%), náusea (20%) y cefalea (10%).

Algunos niños presentaron más de un síntoma durante la prueba.

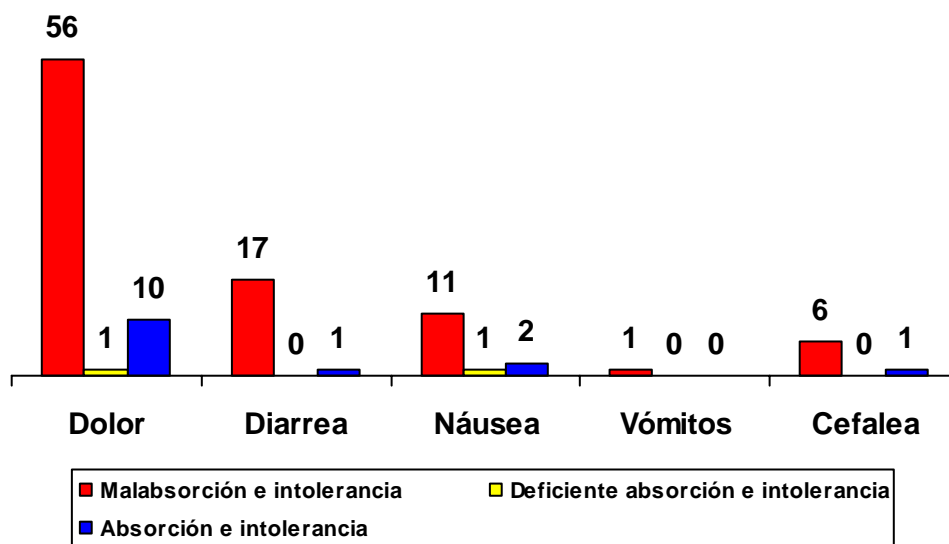


Figura 4.3. Distribución de la muestra 2004-2005 según los fenotipos obtenidos por el BH₂T y los síntomas durante el test

4.1.1.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los motivos de consulta y los síntomas durante el BH₂T

En muchos de los pacientes estudiados, así como se observa en la tabla 4.5 y la figura 4.4, los síntomas que se presentaron durante el BH₂T no se correspondían con los síntomas que generaron la consulta. Por ejemplo, en el caso del dolor abdominal, solamente el 52,7% de los 74 niños que consultaron por este motivo lo presentaron durante el test. Del mismo modo, observamos que sólo 21% de los 19 niños que se presentaron en la consulta por diarrea, acusaron este síntoma durante el BH₂T; que 20,83% de los 24 niños que se presentaron por náuseas repitieron el síntoma durante el test y que sólo 15,38% de 13 los niños que se presentaron por cefalea presentaron el síntoma durante el test. Ninguno de 19 niños que se presentaron por vómitos a la consulta vomitó durante el BH₂T. Algunos niños se presentaron por más de un motivo a la consulta, pudiendo presentar a la vez dolor abdominal y diarrea o dolor abdominal y náuseas etc. Otros niños refirieron más de un síntoma durante la prueba, por ejemplo: dolor abdominal y diarrea o diarrea y náuseas etc.

Tabla 4.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los motivos de consulta y los síntomas durante el BH₂T

Motivos consulta	Dolor		Diarrea		Náusea		Vómitos		Cefalea	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Dolor	39	52,70	8	10,81	10	13,51	0	0	5	6,76
Diarrea	11	57,89	4	21,05	2	10,53	1	5,26	1	5,26
Náusea	12	50	4	16,67	5	20,83	0	0	2	8,33
Vómitos	8	42,10	3	15,79	2	10,53	0	0	1	5,26
Cefalea	8	61,54	5	38,46	3	23,08	0	0	2	15,38

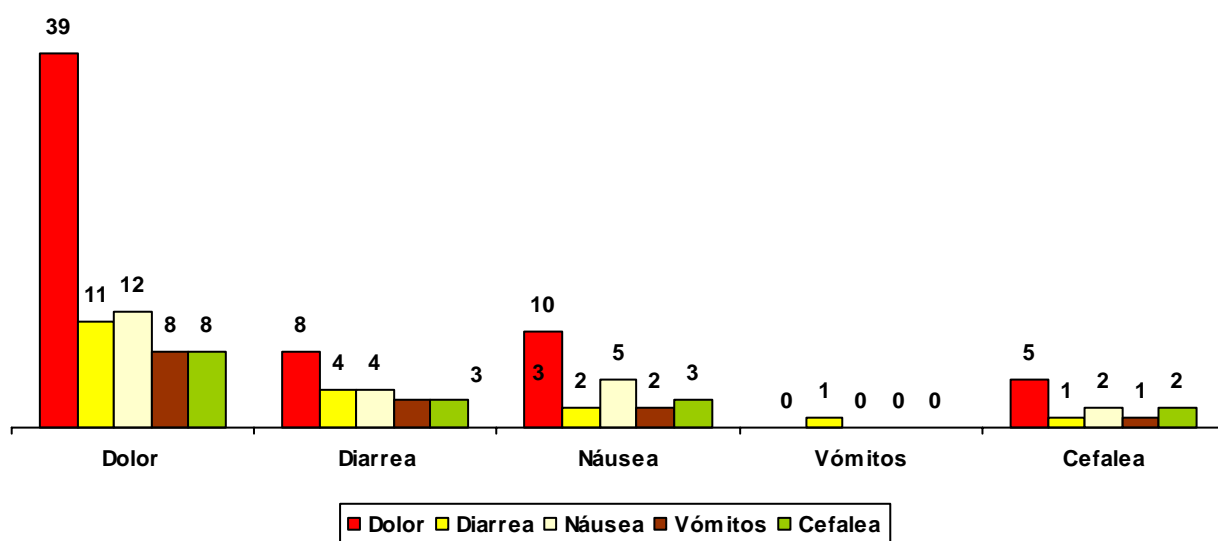


Figura 4.4. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los motivos de consulta y los síntomas durante el BH₂T

4.1.2. Perfil genotípico de la muestra de niños del período 2004-2005

En el estudio de las muestras de ADN obtenidas de los 135 pacientes para genotipar los *SNPs* -13910C/T y -22018G/A, se lograron genotipar 134 y de uno de ellos no se obtuvo ADN de calidad suficiente para el genotipado.

A continuación se muestran los genotipos obtenidos:

4.1.2.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo de ambos *SNPs* C/T-13910 y G/A-22018

Como se observa en la tabla 4.6 y figura 4.5, del total de 134 niños a los cuales se les realizó el genotipado, 70,1% presentaron el genotipo GG + CC, 21,6% el genotipo AG + TC, 6% el genotipo AA + TT y 2,2% el genotipo AG + CC.

Tabla 4.6. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo de ambos *SNPs* 13910C/T y 22018G/A

Genotipos 13910-C/T y 22018-G/A	N° Niños	% Niños
GG + CC	94	70,1
AA + TT	8	6
AG + TC	29	21,6
AG + CC	3	2,2

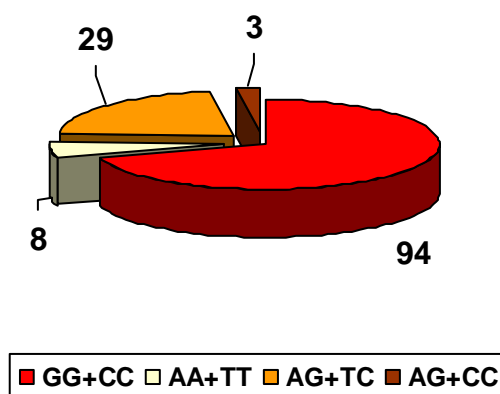


Figura 4.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo de ambos *SNPs* 13910C/T y 22018G/A

4.1.2.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el polimorfismo C/T-13910

La tabla 4.7 y la figura 4.6 muestran que del total de 134 niños a los cuales se les realizó el genotipado, 72,39% resultaron homocigotos CC, 21,64% heterocigotos CT y 5,97% homocigotos TT para el polimorfismo C/T-13910.

Tabla 4.7. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el polimorfismo C/T-13910

C/T-13910	Nº niños	% niños
CC	97	72,39
CT	29	21,64
TT	8	5,97

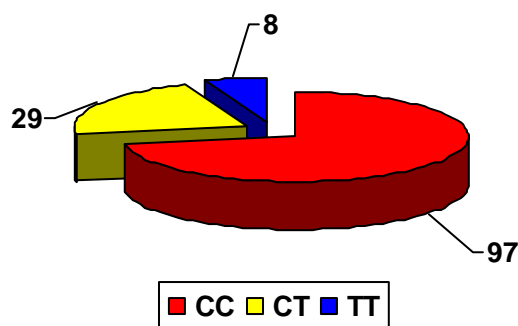


Figura 4.6. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el polimorfismo C/T-13910

4.1.2.3. Distribución de la muestra 2004-2005 según el polimorfismo G/A-22018

Tal como se observa en la tabla 4.8 y la figura 4.7, del total de 134 niños a los cuales se les realizó el genotipado, 70,15% resultaron homocigotos GG, 23,88% heterocigotos GA y 5,97% homocigotos AA.

Tabla 4.8. Distribución de la muestra 2004-2005 según el polimorfismo G/A-22018

G/A-22018	Nº niños	% niños
GG	94	70,15
GA	32	23,88
AA	8	5,97

Distribución según el polimorfismo G/A-22018

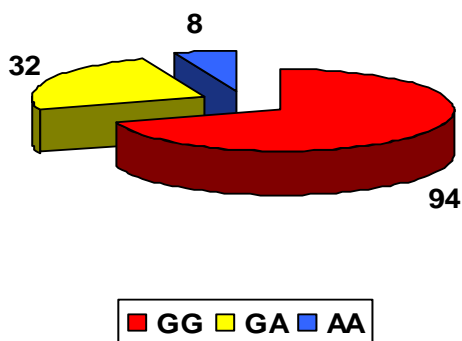


Figura 4.7. Distribución de la muestra 2004-2005 según el polimorfismo G/A-22018

4.1.2.4. Distribución de la muestra 2004-2005 según los genotipos y la edad

Se observa en la tabla 4.9 que en el grupo de edad de 2-5 años, la mayoría de los niños presentaron el genotipo AG + TC. Sin embargo, a partir de los 6 años de edad, se encontró una distribución genotípica diferente, la mayoría de los niños de nuestra muestra presentando el genotipo GG + CC.

Tabla 4.9. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo y la edad

Edad	GG+CC	AA+TT	AG+TC	AG+CC
2	1	0	0	0
3	1	0	2	0
4	0	0	3	0
5	0	2	2	0
6	6	0	1	0
7	5	1	7	0
8	13	1	4	0
9	8	0	1	0
10	8	0	2	0
11	9	3	1	1
12	10	0	1	1
13	10	0	0	1
14	14	1	2	0
15	4	0	1	0
16	4	0	1	0
17	1	0	0	0
19	0	0	1	0
Total	94	8	29	3

4.1.2.5. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y el sexo

En la tabla 4.10 y figura 4.8, se observa que del total de 94 niños que presentaron el genotipo GC, 42,55% (40 niños) fueron varones y 57,45% (54 niñas) fueron mujeres. Los 8 niños que presentaron el genotipo AT se distribuyeron en partes iguales: 50% (4 niños) varones y 50% (4 niñas) mujeres. Del total de 29 niños que presentaron el genotipo AG/TC, 41,38% (12 niños) fueron varones y 58,62% (17 niñas) fueron mujeres. Los 3 niños que presentaron el genotipo AG/CC fueron mujeres.

Tabla 4.10. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo y el sexo

Genotipo	Varones		Mujeres	
	Nº	%	Nº	%
GG + GC	40	42,55	54	57,45
AA + TT	4	50	4	50
AG + TC	12	41,38	17	58,62
AG + CC	0	0	3	100

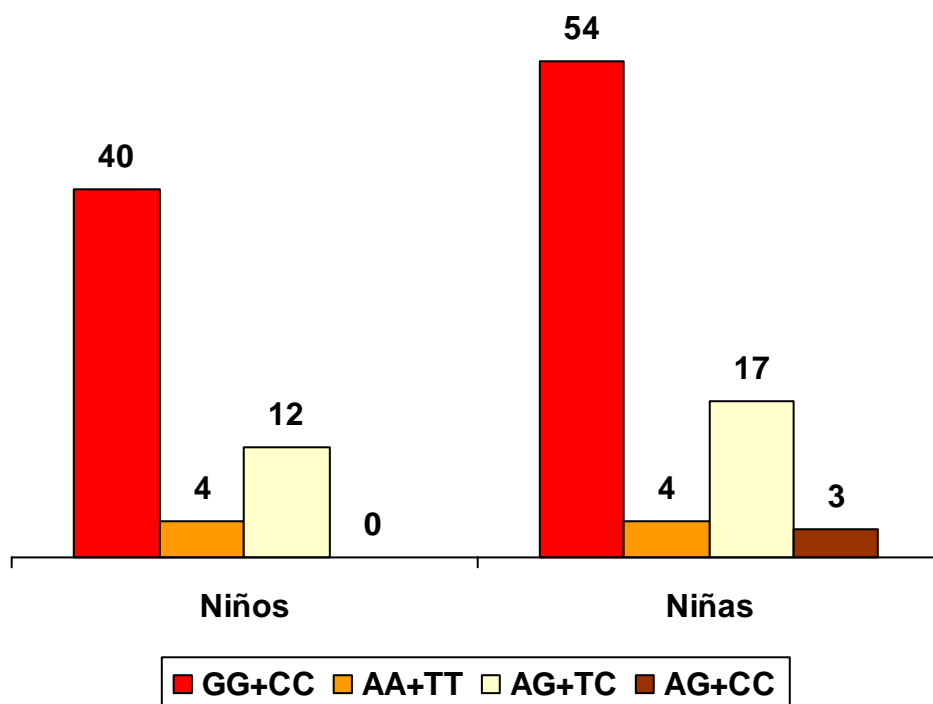


Figura 4.8. Distribución de la muestra del 2004-2005 según el genotipo y el sexo

4.1.2.6. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y los síntomas presentados durante el BH₂T

4.1.2.6.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y el número de síntomas durante el BH₂T

Del total de 132 niños en cuyo caso se recogieron los síntomas durante el test BH₂T, 31,06% presentaron un solo síntoma, 18,18% presentaron 2 síntomas y 3,79% presentaron 3 síntomas.

Como se puede observar en la tabla 4.11 y la figura 4.9, de los 41 niños que presentaron sólo un síntoma durante el BH₂T, la mayoría (85,37%) tenían el genotipo GG/CC, 12,19%% el genotipo AG/TC, 2,44% el genotipo AA/TT, y ninguno tenía el genotipo AG/CC.

De los 24 niños que presentaron dos síntomas durante el BH₂T, la mayoría (79,17%) tenían el genotipo GG/CC, 8,33% el genotipo AA/TT, 8,33%% el genotipo AG/TC y 4,17% tenía el genotipo AG/CC.

Los 5 niños que presentaron tres síntomas durante el test presentaron el genotipo GG/CC.

Tabla 4.11. Distribución de la muestra según los genotipos y el número de síntomas durante el BH₂T

Nº síntomas	GG + CC		AA + TT		AG + TC		AG + CC	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	35	85,37	1	2,44	5	12,19	0	0
2	19	79,17	2	8,33	2	8,33	1	4,17
3	5	100	0	0	0	0	0	0

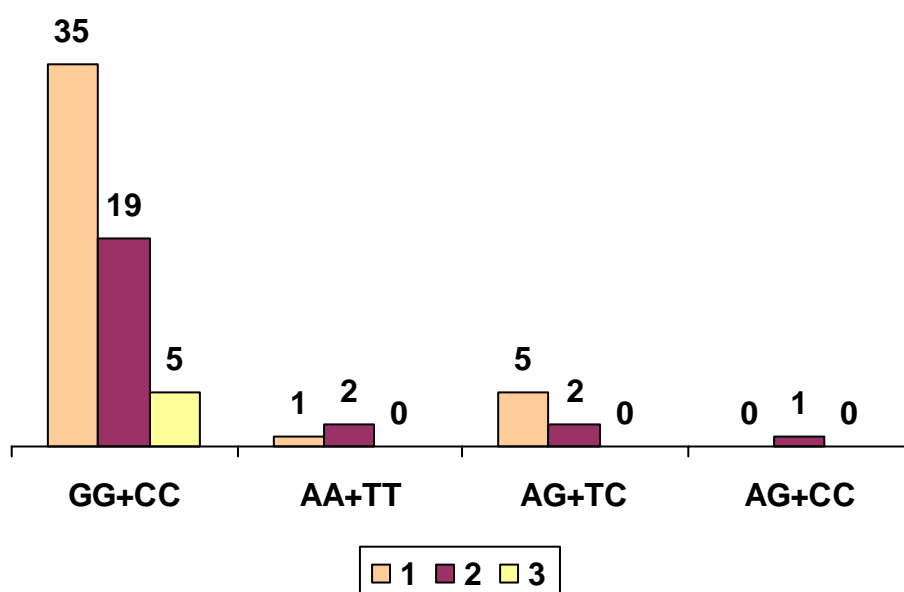


Figura 4.9. Distribución de la muestra según los genotipos y el número de síntomas durante el BH₂T

4.1.2.6.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los genotipos y el tipo de síntomas durante el BH₂T

En la tabla 4.12 y figura 4.10 se observa que los 67 niños que presentaron dolor abdominal durante el test BH₂T, la mayoría (85,07%) tenían el genotipo GG+CC, 10,46% el genotipo AG+TC, 2,98% el genotipo AA+TT y 1,49% el genotipo AG+CC.

La distribución genotípica de los 18 niños que presentaron diarrea durante el test BH₂T fue parecida: la mayoría (88,88%) tenían el genotipo GG/CC, 5,56% el genotipo AA/TT, 5,56% el genotipo AG/CC y ninguno tenía el genotipo AG/TC.

De los 14 niños que presentaron náusea durante el test BH₂T, 78,57% tenían el genotipo GG/CC, 7,14% el genotipo AA/TT, 1,43% el genotipo AG/TC y 1,43% el genotipo AG/CC.

El único niño que presentó vómitos durante el BH₂T tenía el genotipo GG/CC.

De los 7 niños que presentaron cefalea durante el test BH₂T, 85,71% tenían el genotipo GG/CC, 14,29% el genotipo AA/TT y ninguno tenía los genotipos AG/TC y AG/CC.

Tabla 4.12. Distribución de la muestra según los genotipos y el tipo de síntomas durante el BH₂T

Tipo de síntomas	GG+CC		AA+TT		AG+TC		AG+CC	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Dolor abdominal	57	85,07	2	2,98	7	10,46	1	1,49
Diarrea	16	88,88	1	5,56	0	0	1	5,56
Náusea	11	78,57	1	7,14	2	1,43	1	1,43
Vómitos	1	100	0	0	0	0	0	0
Cefalea	6	85,71	1	14,29	0	0	0	0

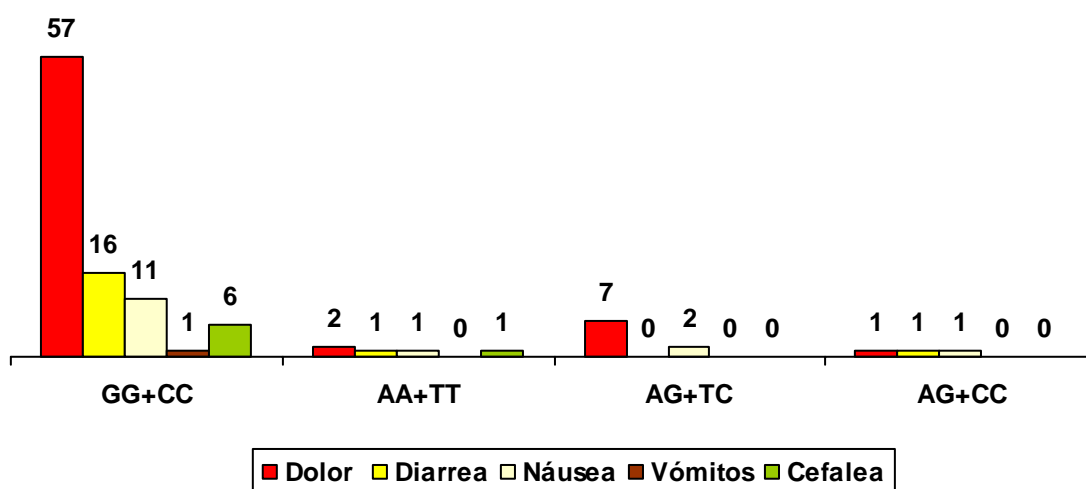


Figura 4.10. Distribución de la muestra según los genotipos y el tipo de síntomas durante el BH₂T

4.1.2.7. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los síntomas-motivo de consulta y los síntomas presentados durante el BH₂T, en los niños con el polimorfismo C/T-13910

Como se observa en la tabla 4.13, en el grupo de los niños que presentaron el homocigoto CC, se encontraron más niños que presentaron dolor abdominal durante el BH₂T que niños que presentaron el mismo síntoma, pero como motivo de consulta (58 vs. 46). Lo mismo ocurre cuando nos referimos a la diarrea (17 vs. 11), pero no en el caso de los demás síntomas, como náuseas (11 vs. 13), vómitos (1 vs. 11) o cefalea (6 vs. 9).

En el caso de los niños que presentaron el heterocigoto CT o el homocigoto TT, asociados con la absorción a la lactosa, se observa que los motivos de consulta superan siempre los síntomas presentados durante el BH₂T.

Tabla 4.13. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los síntomas-motivo de consulta y los síntomas presentados durante el BH₂T, en los niños con el polimorfismo C/T-13910

Síntomas	CC		CT		TT	
	Motivos	BH ₂ T	Motivos	BH ₂ T	Motivos	BH ₂ T
Dolor	46	58	22	7	6	2
Diarrea	12	17	6	0	1	1
Náuseas	13	11	8	2	3	1
Vómitos	11	1	6	0	2	0
Cefalea	9	6	2	0	2	1

4.1.2.8. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los síntomas como motivos de consulta y los síntomas presentados durante el BH₂T, en los niños con el polimorfismo G/A-22018

Lo mismo ocurre cuando nos referimos al *SNP* G/A-22018, así como se observa en la tabla 4.14. En el grupo de los niños que presentaron el homocigoto GG, se encontraron más niños que presentaron dolor abdominal durante el BH₂T que niños que presentaron el mismo síntoma, como motivo de consulta (57 vs. 46). Una situación parecida se observa cuando nos referimos a la diarrea (16 vs. 12), pero no en el caso de los demás síntomas, como náuseas (11 vs. 13), vómitos (1 vs. 11) o cefalea (6 vs. 9).

En el caso de los niños que presentaron el heterocigoto GA o el homocigoto AA, asociados con la absorción a la lactosa, se observa que los motivos de consulta superan siempre los síntomas presentados durante el BH₂T.

Tabla 4.14. Distribución comparativa de la muestra del 2004-2005 según los síntomas-motivo de consulta y los síntomas presentados durante el BH₂T, en los niños con el polimorfismo G/A-22018

Síntomas	GG		GA		AA	
	Motivos	BH2T	Motivos	BH2T	Motivos	BH2T
Dolor	46	57	23	8	6	2
Diarrea	12	16	6	1	1	1
Náuseas	13	11	8	2	3	1
Vómitos	11	1	6	0	2	0
Cefalea	9	6	2	0	2	1

4.1.3. La correlación fenotipo-genotipo

4.1.3.1. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH₂T y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018.

Como se puede observar en la tabla 4.15 y en la figura 4.11, de los 134 niños genotipados para los dos *SNPs* juntos, la mayoría de 70,15% presentaron el genotipo GG+CC, seguido en orden decreciente por el genotipo AG+TC (21,64%), el genotipo AA+TT (5,97%) y el genotipo AG+CC (2,24%).

Tabla 4.15. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH₂T y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018.

Diagnóstico	GG +CC		AA+TT		AG+TC		AG+CC	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción	83	97,65	0	0	0	0	2	2,35
Def. absorción	6	66,67	1	11,11	2	22,22	0	0
Absorción	5	12,5	7	17,5	27	67,5	1	2,5
Total	94	70,15	8	5,97	29	21,64	3	2,24

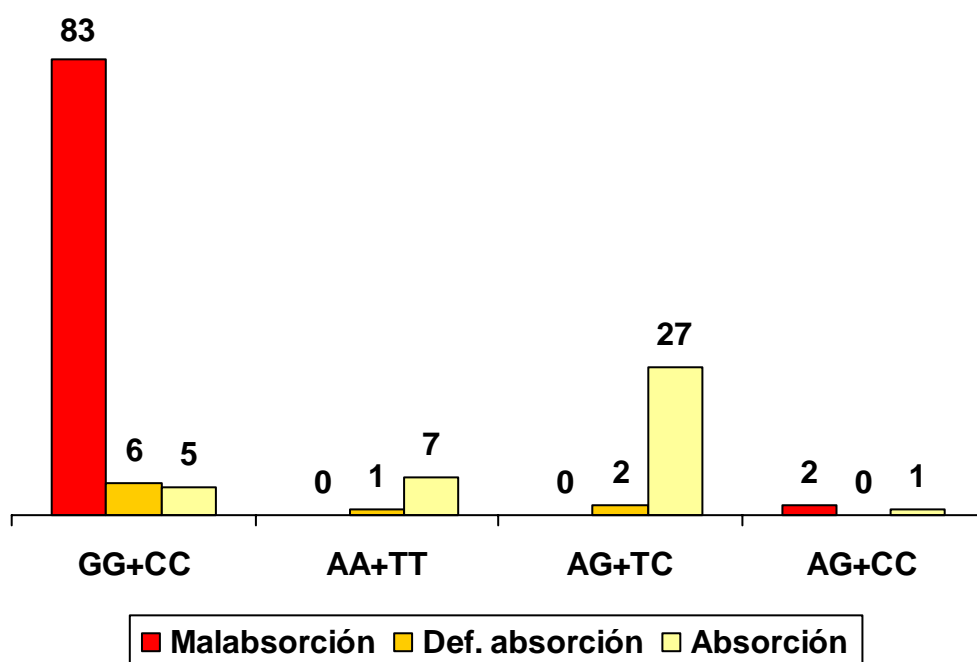


Figura 4.11. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH₂T y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018.

La mayoría de los 85 niños con el fenotipo de malabsorción en la prueba de BH₂T, presentaron el genotipo GG+CC - 97,65% (83 niños) y 2,35% (2 niños) el genotipo AG+CC. Ningún niño presentó los genotipos AA+TT o AG+TC.

Los 9 niños con el fenotipo de deficiente absorción en la prueba de BH₂T, presentaron la mayoría de 66,67% (6 niños) el genotipo GG/CC, seguidos en orden decreciente del genotipo

AG/TC-22,22% (2 niños) y del genotipo AA/TT 11,11% (1 niño). Ningún niño presentó el genotipo AG+CC.

Del total de 40 niños con el fenotipo de absorción en la prueba de BH₂T, la mayoría- 67,5%(27 niños) presentaron el genotipo AG/TC, 17,5% el genotipo AA/TT, 12,5% (5 niños) el genotipo GG/CC y 2,5% (1 niño) el genotipo AG/CC.

4.1.3.2. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH₂T y el genotipo C/T-13910

Tomando en consideración el *SNP* -13910 C/T, así como se observa en la tabla 4.16 y la figura 4.12, todos los 85 niños malabsorbentes presentaron el homocigoto CC (63,43% del total de 134 niños).

De los 9 niños deficientes absorbentes, la mayoría de 66,66% presentaron el homocigoto CC, 22,22% el heterocigoto CT y 11,11% el homocigoto TT.

Los 40 niños absorbentes se distribuyeron de forma diferente, la mayoría presentando el heterocigoto CT (67,5%), seguido del homocigoto TT (17,5%) y 15% el homocigoto CC.

Tabla 4.16. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH₂T y el genotipo C/T-13910

Diagnóstico	CC		CT		TT	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción	85	100	0	0	0	0
Def. absorción	6	66,66	2	22,22	1	11,11
Absorción	6	15	27	67,5	7	17,5
Total	94	70,15	32	23,88	8	5,97

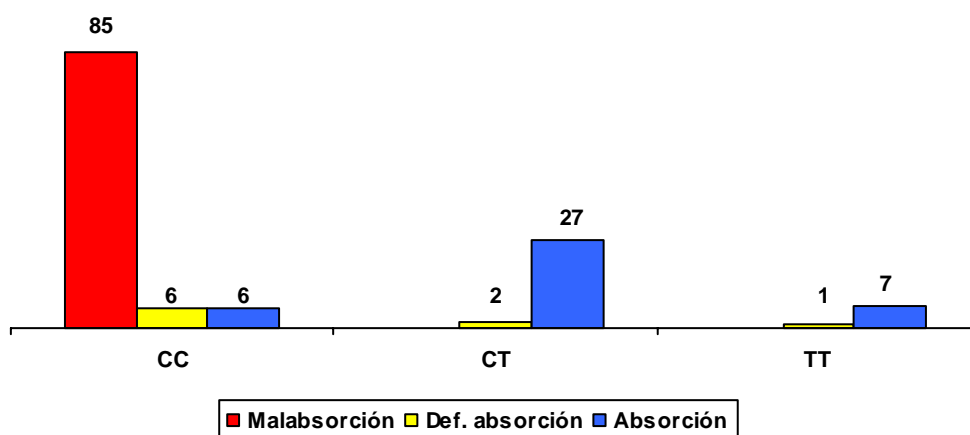


Figura 4.12. Distribución de la muestra del 2004-2005 según los fenotipos obtenidos en BH₂T y el genotipo C/T-13910

En la tabla 4.17 se observa que en el subgrupo representado por el heterocigoto CT y compuesto por 29 niños, la mayoría de 75,86% de los niños fueron absorbentes y tolerantes, 17,24% absorbentes e intolerantes y 6,19% deficiente absorbentes y tolerantes.

Tabla 4.17. Distribución de la muestra del 2004-2005 según y el genotipo C/T-13910 los fenotipos obtenidos en BH₂T

Grupo	Malabsorción intolerancia		Malabsorción tolerancia		Deficiente intolerancia		Deficiente tolerancia		Absorción intolerancia		Absorción tolerancia	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CC	58	59,79	27	27,84	0	0	6	6,19%	2	2,06	4	4,12
CT	0	0	0	0	1	3,45	1	3,45	5	17,24	22	75,86
TT	0	0	0	0	0	0	1	12,50	3	37,50	4	50

En el subgrupo representado por el homocigoto TT y compuesto por 8 niños, 50% de los niños fueron absorbentes y tolerantes, 37,50% absorbentes e intolerantes y 12,50% deficiente absorbentes y tolerantes.

En el subgrupo representado por el homocigoto CC y compuesto por 97 niños, la mayoría presentaron el fenotipo de malabsorción (59,79% intolerantes y 27,84% tolerantes), seguidos de los deficientes absorbentes y absorbentes, en proporciones iguales de 6,19%.

4.1.3.3. La distribución de los pacientes según los fenotipos obtenidos en BH₂T y el genotipo G/A-22018.

Tomando en consideración el -22018 G/A, así como se observa en la tabla 4.18 y la figura 4.13, la mayoría de los 85 niños malabsorbentes presentaron el homocigoto GG (97,65%) y sólo 2,35% el heterocigoto AG.

De los 9 niños deficientes absorbentes, la mayoría de 66,66% presentaron el homocigoto GG, 22,22% el heterocigoto GA y 11,11% el homocigoto AA.

Los 40 niños absorbentes se distribuyeron de forma diferente, la mayoría presentando el heterocigoto AG (70%), seguido del homocigoto AA (17,5%) y 12,5% el homocigoto GG.

Tabla 4.18. La distribución de los pacientes según los fenotipos obtenidos en BH₂T y el genotipo G/A-22018

Diagnóstico	GG		GA		AA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción	83	97,65	2	2,35	0	0
Def. absorción	6	66,66	2	22,22	1	11,11
Absorción	5	12,5	28	70	7	17,5
Total	94	70,15	32	23,88	8	5,97

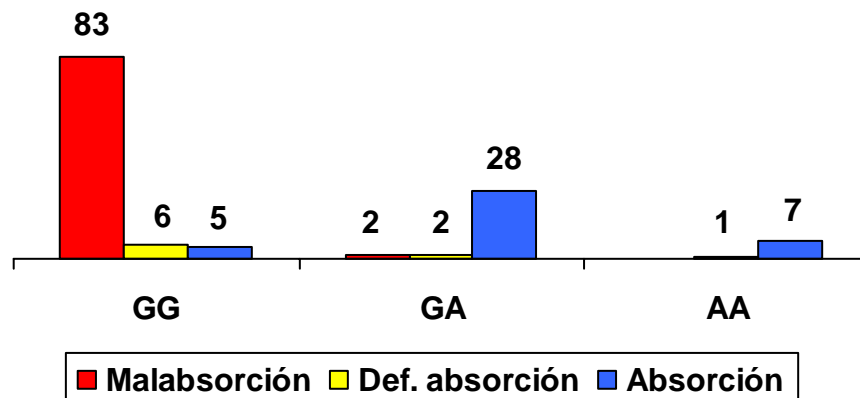


Figura 4.13. La distribución de los pacientes según los fenotipos obtenidos en BH₂T y el genotipo G/A-22018

En la tabla 4.19 se observa que al homocigoto GG le corresponde en la mayoría de los niños (88,30%) el fenotipo de malabsorción, y el resto de 6,38% deficiente absorción y 5,32% de absorción.

Tabla 4.19 Distribución según fenotipo en función de los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo del SNP -22018 G/A

	Malabsorció intolerancia		Malabsorción tolerancia		Deficiente intoleranci		Deficiente tolerancia		Absorción intolerancia		Absorción tolerancia	
Grupo	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
GG	57	60,64	26	27,66	0	0	6	6,38	2	2,13	3	3,19
GA	1	3,12	1	3,12	1	3,12	1	3,12	5	15,63	23	71,87
AA	0	0	0	0	0	0	1	12,5	3	37,5	4	50

En el caso del heterocigoto GA, se encontraron 87,5% absorbentes y el resto de 6,25% deficiente absorbentes y el homocigoto AA tiene 87,50% absorbentes y 12,50 deficiente absorbentes.

En el caso del homocigoto AA, se observa que la mayoría presenta el fenotipo de absorción (87,5%) y sólo 12,5% de deficiente absorción.

En la tabla 4.19 se observa también que en el grupo GG (94 niños), la mayoría (60,64%) de los niños fueron malabsorbentes e intolerantes, 27,66% malabsorbentes y tolerantes, 6,38% deficientes absorbentes y tolerantes, 2,13% absorbentes intolerantes y 3,19% absorbentes tolerantes. Ningún niño fue deficiente absorbente y tolerante.

En el subgrupo representado por el heterocigoto GA y compuesto por 32 niños, la mayoría (71,87%) de los niños fueron absorbentes y tolerantes, 15,63% absorbentes e intolerantes y el resto de los niños, en proporciones iguales de 3,12%, fueron: deficiente

absorbentes y tolerantes, deficiente absorbentes e intolerantes, malabsorbentes y tolerantes y malabsorbentes e intolerantes

En el subgrupo representado por el homocigoto AA y compuesto por 8 niños, la mitad de los niños fueron absorbentes y tolerantes, 37,50% absorbentes e intolerantes y 12,50% deficiente absorbentes y tolerantes.

4.1.3.4. Descripción de los casos con resultados discrepantes entre el test ADN y el BH₂T

En los tres supuestos, teniendo en cuenta ambos polimorfismos juntos o cada uno de ellos por separado, se observa una buena correlación genotipo-fenotipo, no obstante existe un grupo de doce pacientes en los que esta correlación no es perfecta.

Los **12 casos de pacientes que presentaron discrepancias** entre los resultados del test ADN y el BH₂T son presentados en la fig. 4.14 y la tabla 4.20 de abajo:

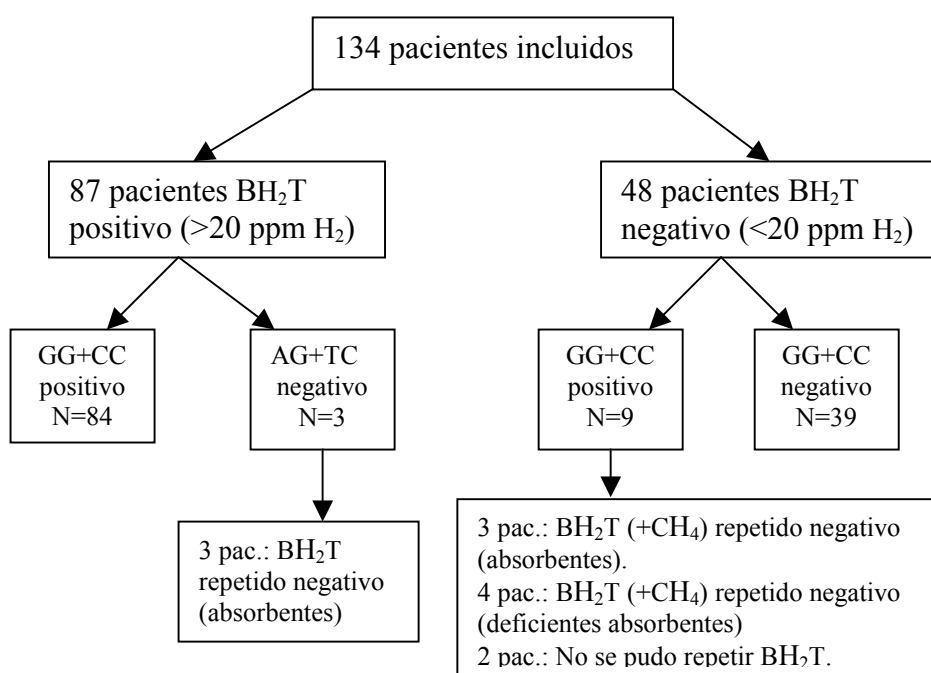


Figura 4.14 Esquema de los resultados del BH₂T y el genotipado

Como se observa en las tablas 4.20 y 4.21 y en la figura 4.14, entre los 48 pacientes con un BH₂T negativo, se encontraron 9 pacientes absorbentes (7 tolerantes y 2 intolerantes) y sin embargo positivos para las variantes c.1993+327C y c.1438+117G, presentando el genotipo GG+CC, asociado con la malabsorción. Los pacientes fueron reprogramados para el BH₂T y en tres de los pacientes que repitieron el test se obtuvo el mismo resultado, de absorción a la lactosa. Cuatro niños presentaron un incremento de H₂ espirado mayor de 10 ppm y se

interpretaron como deficiente absorbentes. Dos niños no pudieron ser contactados para repetir la prueba BH₂T. En el momento de la segunda prueba de H₂ espirado, a los siete niños presentes se les hizo el test con CH₄, el resultado siendo el mismo que en el test que medía el H₂. En uno de los casos, una niña de 4 años que no presentó ningún síntoma durante el BH₂T, no se notó un aumento del H₂ espirado con respecto al nivel basal. Se interpretó el caso como no-excretor de H₂, pudiendo ser el resultado negativo una consecuencia de la falta de bacterias del colon, con la siguiente no producción de H₂ ni de CH₄ (Levitt-1970).

Tabla 4.20 Relación entre los resultados de los dos BH₂T (2004 y 2005) y los genotipos

Nº pacientes	Primer BH ₂ T (2004)	Segundo BH ₂ T (2005)	Genotipo
3	Absorbentes (-)	Absorbentes (-)	GG+CC
4	Absorbentes (-)	Def. absorbentes (-)	GG+CC
2	Absorbentes (-)	?	GG+CC
3	Malabsorbentes (+)	Absorbentes (-)	AG+TC

Tres niños de los 87 que presentaron malabsorción en el primer BH₂T (test positivo), en el segundo BH₂T presentaron un incremento de H₂<20 ppm y se interpretaron como deficiente absorbentes (test negativo). Dos de ellos fueron tolerantes y uno presentó síntomas después de la sobrecarga de lactosa. Estos tres niños fueron heterocigotos AG/TC, es decir el análisis de ADN sugirió la persistencia de la lactasa.

Tabla 4.21. Relación detallada para cada paciente entre los genotipos, los fenotipos, la producción de H₂ espirado (pico e incremento de H₂) y el consumo de lácteos

Paciente	Edad	Sexo	Genotipo	2004	2005	Pico	Δ H ₂	Lácteos
1	2	V	GG+CC	AT	AT	8	4	*
2	3	M	GG+CC	AT	AT	1	0	**
3	9	M	GG+CC	AT	-	7	6	*
4	6	M	GG+CC	AI	AI	18	8	***
5	11	M	GG+CC	AI	-	8	2	*
6	10	V	GG+CC	AT	DT	8	1	**
7	13	M	GG+CC	DT	DT	20	12	*
8	9	M	GG+CC	AT	DT	2	0	****
9	13	M	GG+CC	AT	DT	7	4	*
10	12	V	AG+TC	MI	AI	28	20	*
11	5	V	AG+TC	AI	DI	25	24	**
12	8	M	AG+TC	MI	AT	36	34	*

El pico H₂ y el Δ H₂ representan la prueba BH₂T del 2004

* Ingesta de leche, yogur y queso

** Ingesta de leche baja en lactosa

*** Ingesta sólo de yogur (no toma leche)

**** No toma lácteos

4.1.4. La evaluación de la validez y de la seguridad de la prueba genética para detectar la malabsorción a la lactosa en los niños gallegos

Hemos clasificado los niños en función del fenotipo obtenido después del BH₂T en dos grupos: el primer grupo de malabsorbentes y en el segundo grupo hemos incluido los deficientes absorbentes en la misma categoría con los absorbentes, considerando el punto de corte en 20 ppm de hidrógeno espirado en el BH₂T.

Hemos tomado en consideración los 2 polimorfismos implicados en la malabsorción a la lactosa, C/T-13910 y G/A-22018, los 2 juntos y después cada uno por separado y hemos comparado los valores de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo y la eficiencia diagnóstica.

4.1.4.1. La validez de los dos polimorfismos juntos (C/T-13910 y G/A-22018) para detectar la malabsorción a la lactosa

En el estudio de ambos polimorfismos juntos y considerando el genotipo GG + CC como prueba positiva y los genotipos AA + TT, AG + TC y AG + CC como prueba negativa, se han obtenido para la detección de pacientes malabsorbentes, los valores de sensibilidad de 88,29%, especificidad de 95%, valor predictivo positivo 97,64%, valor predictivo negativo de 77,55%, valor global de la prueba 90,29%, tal como se muestran en la tabla 4.22:

Tabla 4.22. La validez de los dos polimorfismos juntos (C/T-13910 y G/A-22018) para diagnosticar la malabsorción a la lactosa

Variable	Media	Intervalo de confianza	
		Superior	Inferior
Sensibilidad	88,29%	79,62	93,73
Especificidad	95,00%	81,79	99,12
Valor predictivo positivo	97,64%	90,96	99,59
Valor predictivo negativo	77,55%	63,01	87,75
Valor global de la prueba	90,29%	83,66	94,52
Razón de verosimilitud positiva	17,66	4,56	68,31
Razón de verosimilitud negativa	0,12	0,07	0,21

4.1.4.2. La validez del polimorfismo C/T-13910 para detectar la malabsorción a la lactosa

En este caso se considera el genotipo CC como positivo y los genotipos CT y TT como negativos. Se han obtenido los valores siguientes para los parámetros de: sensibilidad 100%, especificidad 75,51%, valor predictivo positivo 87,62%, valor predictivo negativo 100%, valor global de la prueba de 91,04%, tal como se muestra en la tabla 4.23:

Tabla 4.23. La validez del polimorfismo C/T-13910 para detectar la malabsorción a la lactosa

Variable	Media	Intervalo de confianza	
		Superior	Inferior
Sensibilidad	100%	94,61	99,89
Especificidad	75,51%	60,82	86,19
Valor predictivo positivo	87,62%	79,00	93,16
Valor predictivo negativo	100%	88,28	99,75
Valor global de la prueba	91,04%	84,55	95,08
Razón de verosimilitud positiva	4,08	2,49	6,67
Razón de verosimilitud negativa	0,00	*** **	*** **

4.1.4.3. La validez del polimorfismo G/A-22018 para detectar la malabsorción a la lactosa

En cuanto al polimorfismo G/A-22018, se considera el genotipo GG como positivo y los genotipos GA y AA como negativos. Como se puede observar en la tabla 4.24, los parámetros mencionados anteriormente tienen los valores siguientes: sensibilidad 94,68%, especificidad 87,50%, valor predictivo positivo 94,68%, valor predictivo negativo 87,50%, valor global de la prueba 92,53%.

Tabla 4.24. La validez del polimorfismo G/A-22018 para detectar la malabsorción a la lactosa

Variable	Media	Intervalo de confianza	
		Superior	Inferior
Sensibilidad	94,68%	87,45	98,02
Especificidad	87,50%	72,39	95,30
Valor predictivo positivo	94,68%	87,45	98,02
Valor predictivo negativo	87,50%	72,39	95,30
Valor global de la prueba	92,53%	86,35	96,16
Razón de verosimilitud positiva	7,57	3,33	17,22
Razón de verosimilitud negativa	0,06	0,02	0,14

4.1.4.4. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos, para diagnosticar la malabsorción a la lactosa

Los resultados finales de la evaluación del test genético para identificar los pacientes con malabsorción a la lactosa son los siguientes:

Tabla 4.25. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos para diagnosticar la malabsorción a la lactosa

Parámetro (%)	CC (C/T-13910)	GG (G/A-22018)	GG + CC
Sensibilidad	100	97,6	94,7
Especificidad	75,5	77,5	87,5
Valor predictivo positivo	87,6	88,3	94,7
Valor predictivo negativo	100	95	87,5

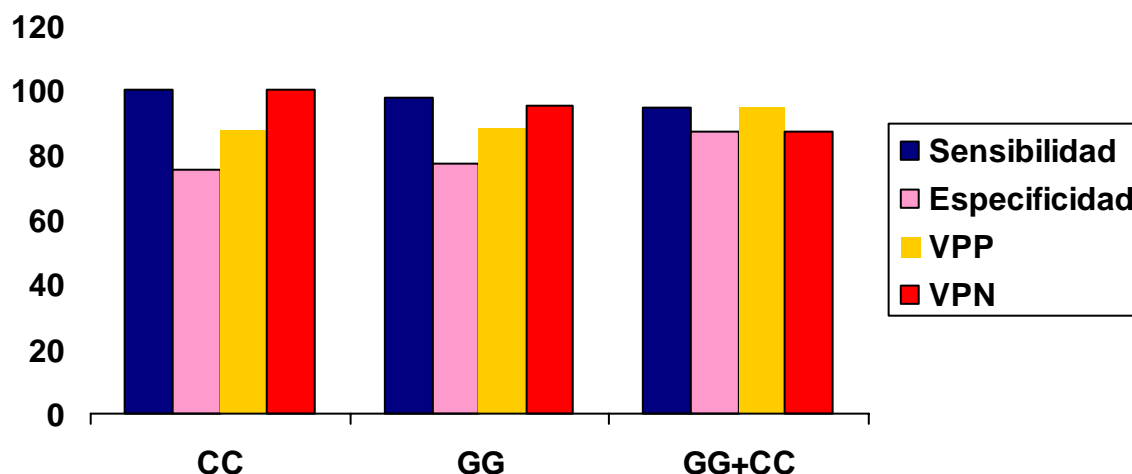


Figura 4.15. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los *SNPs* C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos para diagnosticar la malabsorción a la lactosa

Como se observa en la tabla 4.25 y la figura 4.15, la sensibilidad es mayor, de hecho llega al 100%, cuando se utiliza el polimorfismo C/T-13910 (100%) frente al polimorfismo G/A-22018 (97,6%) o a los 2 polimorfismos juntos (94,7%).

La especificidad, sin embargo es mayor cuando se utilizan los 2 polimorfismos juntos (87,5%) que cuando se utilizan por separado: el polimorfismo G/A-22018 (77,5%) o el polimorfismo C/T-13910 (75,5%).

En cuanto al valor predictivo positivo sucede lo mismo, este siendo mayor cuando se utilizan los 2 polimorfismos juntos (94,7%) que si se utilizaran por separado el polimorfismo G/A-22018 (88,3%) o el polimorfismo C/T-13910 (87,6%).

El mayor valor predictivo negativo se obtiene cuando se utiliza sólo el polimorfismo C/T-13910 (100%), al igual que ocurre con la sensibilidad.

4.1.5. Distribución alélica de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en la población pediátrica gallega estudiada

En la tabla 4.26 se observa que la frecuencia del alelo C es más grande tanto en los casos como en los controles (0,972 y 0,587, respectivamente) que la frecuencia del alelo G (0,966 y 0,575), siendo entonces el polimorfismo C/T-13910 el polimorfismo funcional.

Tabla 4.26. La distribución alélica de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en la población pediátrica

Alelo mayoritario	SNP	Frecuencia casos	Frecuencia controles	Chi cuadrado	p
C	C/T	0.972	0.587	80.623	$2.732 * 10^{-19}$
G	G/A	0.966	0.575	81.327	$1.912 * 10^{-19}$

En la tabla 4.27 se observa que la frecuencia del haplotipo GC es más grande tanto en los casos como en los controles (0,966 y 0,575, respectivamente) que la frecuencia del haplotipo AT (0,028 y 0,413, respectivamente) o que la frecuencia del haplotipo AC (0,006 y 0,012, respectivamente).

Tabla 4.27. La distribución de los haplotipos encontrados (GC, AT, AC) en la población pediátrica

Haplotipo	Frecuencia total	Frecuencia casos	Frecuencia controles	Chi cuadrado	p
GC	0.736	0.966	0.575	81.327	$1.912 * 10^{-19}$
AT	0.255	0.028	0.413	80.623	$2.732 * 10^{-19}$
AC	0.009	0.006	0.012	0.433	0.5103

$D' = 1$

$r^2 = 0.953$

Los valores de D' y r cuadrado nos están indicando que estos dos SNPs (C/T-13910 y G/A-22018) están en desequilibrio de ligamiento prácticamente completo, por eso hay sólo dos haplotipos mayoritarios (GC y AT), en lugar de 4, que sería lo normal de no estar en desequilibrio de ligamiento. Otra forma de decirlo sería mencionar la escasa frecuencia del haplotipo AC tanto en controles como en pacientes. El hecho de que estén en desequilibrio de ligamiento completo, hace que genotipar los dos SNPs sea una práctica redundante, ya que con solo uno de ellos estaríamos obteniendo la información que necesitamos. La asociación encontrada es muy significativa (p muy baja), tal como se observa en la tabla 4.27 y se sigue manteniendo haciendo permutaciones, por lo que la corrección de Bonferroni no es necesaria.

4.1.6. Distribución de la muestra de 134 niños genotipados en 3 grupos de edad, utilizando el SNP C/T-13910

La muestra de 134 niños analizados utilizando el BH₂T y la prueba genética de ADN, se clasificó en 3 grupos de edad, de 2-5 años (11 niños), de 6-11 años (71 niños) y mayores de 12 años (52 niños), de acuerdo con la estratificación propuesta por Rasinperä (2004).

4.1.6.1. Grupo 2-5 años

Se observa en la tabla 4.28 y en la figura 4.16 que en el grupo de edad de 2-5 años, compuesto por 11 niños, no se encontró ningún malabsorbente y sólo se encontró un deficiente absorbente. El resto de 10 niños fueron absorbentes, es decir, hasta la edad de 5 años, los niños gallegos conservan todavía la actividad lactásica y pueden metabolizar la lactosa, a pesar de que 2 de ellos tuvieron el genotipo CC, asociado con la malabsorción a la lactosa. Del resto de 9 niños, la mayoría de 7 niños, presentaron el genotipo heterocigoto CT y sólo 2 el homocigoto TT, estos últimos genotipos siendo asociados con la absorción a la lactosa.

Tabla 4.28. Distribución del grupo de 2-5 años de edad según los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo C/T-13910

Fenotipo	CC		CT		TT	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción	0	0	0	0	0	0
Def. absorción	0	0	1	100	0	0
Absorción	2	20	6	60	2	20

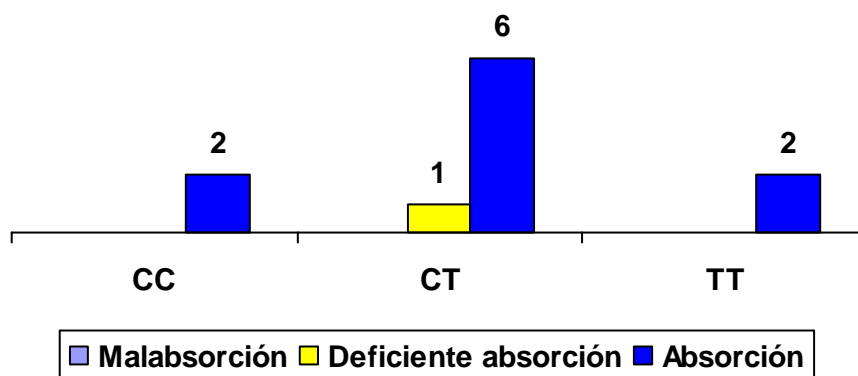


Figura 4.16. Distribución del grupo de 2-5 años de edad según los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo C/T-13910

4.1.6.2. Grupo 6-11 años

En la tabla 4.29 y en la figura 4.17 se observa que del total de 71 niños que componen el grupo de edad más numeroso de nuestra muestra, es decir los niños con edades entre 6-11 años, la mayoría fueron malabsorbentes (63,38%) y todos ellos presentaron el genotipo CC, asociado con la malabsorción. Se observa entonces una correspondencia perfecta entre el diagnóstico positivo del BH₂T y el diagnóstico positivo del test genético para el SNP C/T-13910. No se puede decir lo mismo sobre la correspondencia entre el BH₂T negativo (absorbentes y deficientes absorbentes) y el test genético negativo (los genotipos CT y TT), donde se observaron discrepancias. Así, los 3 niños deficiente absorbentes presentaron los 3 genotipos C/T-13910: CC, CT y TT. En cuanto a los 23 absorbentes, la mayoría de 65,22% fueron heterocigotos CT y el resto, en proporciones iguales, homocigotos CC (17,39%) y homocigotos TT (17,39%).

Tabla 4.29. Distribución del grupo de 6-11 años de edad según los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo C/T-13910

Fenotipo	CC		CT		TT	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción	45	100	0	100	0	100
Def. absorción	1	33,33	1	33,33	1	33,33
Absorción	4	17,39	15	65,22	4	17,39

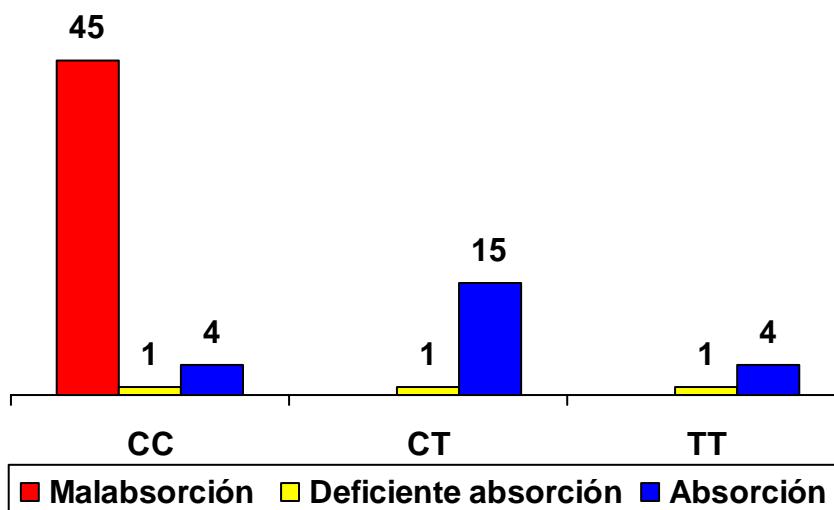


Figura 4.17. Distribución del grupo de 6-11 años de edad según los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo C/T-13910

4.1.6.3. Grupo >12 años

En la tabla 4.30 y la figura 4.18 se observa que de los 52 niños mayores de 12 años, la mayoría fueron malabsorbentes (76,92%), todos ellos presentando el genotipo CC, asociado con la malabsorción. Igual que en el grupo anterior, la correspondencia entre BH₂T positivo y el test genético positivo es perfecta. También hay una correspondencia perfecta entre el grupo de absorbentes (13,46%), según el BH₂T (test negativo) y el test genético negativo (heterocigotos CT-85,71% y homocigotos TT-14,29%). Sin embargo, en el grupo de deficientes absorbentes que representan 9,61% del grupo total de 52 niños, se observa una discordancia, todos presentando el genotipo CC, asociado con la malabsorción.

Tabla 4.30. Distribución del grupo >12 años de edad según los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo C/T-13910

Fenotipo	CC		CT		TT	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Malabsorción	40	100	0	0	0	0
Def. absorción	5	100	0	0	0	0
Absorción	0	0	6	85,71	1	14,29

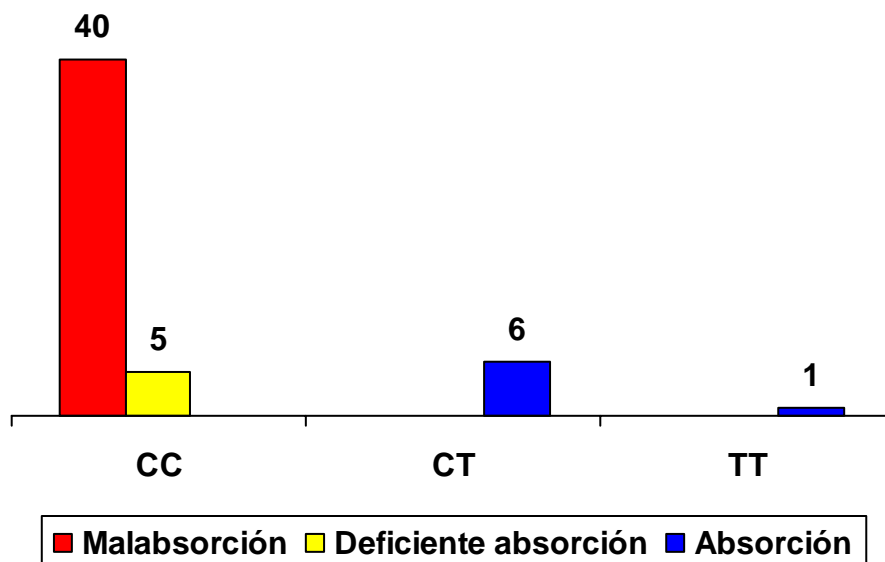


Figura 4.18. Distribución del grupo de 6-11 años de edad según los fenotipos obtenidos en el BH₂T y el genotipo C/T-13910

4.1.6.4. Comparación entre los 3 grupos de edad

En la tabla 4.31 se observa que la **sensibilidad** de la prueba genética, utilizando el *SNP* C/T-13910, es decir la probabilidad que para un sujeto malabsorbente se obtenga un resultado positivo en la prueba genética (el genotipo CC), es nula en el grupo de edad entre 2-5 años. Sin embargo, en los dos grupos de mayor edad, la sensibilidad es de 100%, es decir el test genético que utiliza el *SNP* C/T-13910, tiene la capacidad máxima de detectar la malabsorción. Todos los niños mayores de 6 años que obtuvieron un resultado positivo en la prueba de ADN (genotipo CC) fueron malabsorbentes.

En cuanto a la **especificidad** de la prueba genética, se observa que tiene el valor más alto encontrado en el grupo de edad de 2-5 años (81,81%) y que desciende poco en el grupo de 6-11 años (80,77%) y mucho más en el grupo mayor de 12 años. Es decir, la probabilidad que para un niño absorbente, según el BH₂T, se obtenga un resultado negativo en la prueba genética (los genotipos CT o TT), va disminuyendo con la edad.

El valor predictivo positivo, es decir la probabilidad de ser malabsorbente si se obtiene un resultado positivo en el test genético (el genotipo CC) tuvo un valor nulo en el grupo de edad de 2-5 años. En el grupo de 6-11 años, obtuvimos un resultado mayor (90%) que en el grupo de 2-5 años y que en el grupo de >12 años (88,88%).

El valor predictivo negativo, es decir la probabilidad de que un niño con resultado negativo en la prueba genética (los genotipos CT o TT) sea realmente sano (absorbente), fue de 100% en todos los grupos de edad de nuestra muestra.

Tabla 4.31. Comparación de los parámetros de validez de la prueba genética utilizando el *SNP* C/T-13910, en los 3 grupos de edad de niños

Parámetro	2-5 años (n=11)	6-11 años (n=71)	>12 años (n=52)
Sensibilidad	0	100%	100%
Especificidad	81,81%	80,77%	58,33%
VPP	0	90%	88,88%
VPN	100%	100%	100%

4.1.7. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018

La muestra de los pacientes participantes en el test de hidrógeno espirado se divide en proporciones comparables de pacientes tolerantes a la lactosa (47%) y de pacientes intolerantes (53%).

4.1.7.1. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos C/T-13910 Y G/A-22018 considerados juntos

Como se observa en la tabla 4.32 y en la figura 4.19, del total de 94 pacientes con el polimorfismo GG + CC, asociado con la malabsorción a la lactosa, la mayoría fueron intolerantes (63,83%).

Los polimorfismos AA + TT, AG + TC y AG + CC, asociados con la absorción a la lactosa, presentaron una proporción más grande de tolerantes que de intolerantes (62,5%, 75,86% y 66,67%, respectivamente).

Tabla 4.32. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos C/T-13910 y G/A-22018 considerados juntos

Fenotipo	GG+ CC		AA + TT		AG + TC		AG + CC	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Tolerantes	34	36,17	5	62,5	22	75,86	2	66,67
Intolerantes	60	63,83	3	37,5	7	24,14	1	33,33

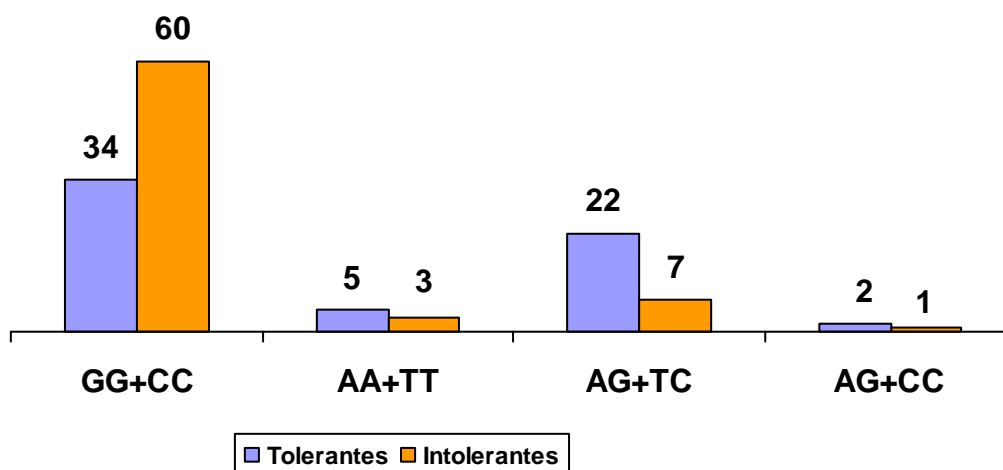


Figura 4.19. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y los genotipos C/T-13910 y G/A-22018 considerados juntos

4.1.7.2. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo C/T-13910

Así como se observa en la tabla 4.33 y en la figura 4.20, la mayoría de los 63 pacientes tolerantes, presentaron el polimorfismo CC (57,14%), asociado con la malabsorción a la lactosa y el resto los polimorfismos CT y TT, asociados con la absorción a la lactosa (34,92% y 7,94%, respectivamente). En cuanto a los pacientes intolerantes, la proporción del polimorfismo CC fue mucho más grande (85,91%), en comparación con los otros dos polimorfismos asociados con la absorción a la lactosa, CT y TT (9,86% y 4,23%, respectivamente).

Tabla 4.33. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo C/T-13910

Fenotipo	CC		CT		TT	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Tolerantes	36	57,14	22	34,92	5	7,94
Intolerantes	61	85,91	7	9,86	3	4,23

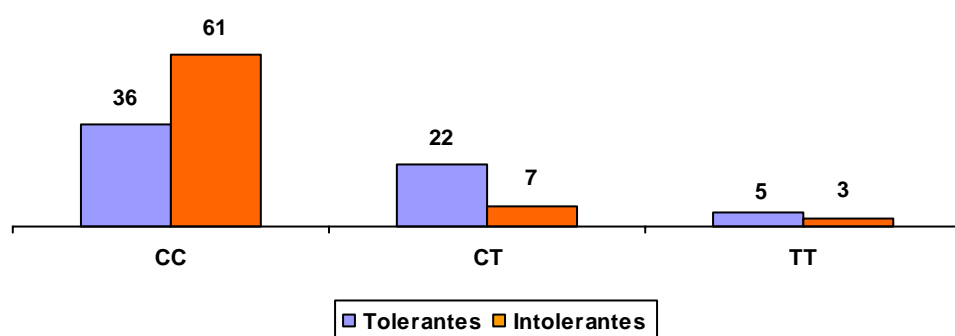


Figura 4.20. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo C/T-13910

En la tabla 4.34, analizando el polimorfismo C/T-13910, observamos que en el caso de los niños con polimorfismo CC, asociado con la malabsorción, la mayoría fueron intolerantes (62,89%), mientras que los polimorfismos CT y TT, asociados con la absorción a la lactosa presentaron una proporción mayoritaria de tolerantes (75,86% y 62,5%, respectivamente).

Tabla 4.34. Distribución de la muestra de niños según los fenotipos de tolerancia/intolerancia y el genotipo C/T-13910 (%)

Fenotipo	Tolerantes	Intolerantes	Total (nº)
CC	37,11	62,89	97
CT	75,86	24,17	29
TT	62,5	37,5	8

4.1.7.3. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo G/A-22018

Así como se observa en la tabla 4.35 y en la figura 4.21, la mayoría de los 63 pacientes tolerantes (53,97%), presentaron el polimorfismo GG, asociado con la malabsorción a la lactosa y el resto los polimorfismos GA y AA, asociados con la absorción a la lactosa (38,09% y 7,94%). En cuanto a los pacientes intolerantes, la proporción del polimorfismo GG fue mucho más grande (84,51%), en comparación con los otros dos polimorfismos asociados con la absorción a la lactosa, GA y AA (11,27% y 4,22%, respectivamente).

Tabla 4.35. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo G/A-22018

Fenotipo	GG		GA		AA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Tolerantes	34	53,97	24	38,09	5	7,94
Intolerantes	60	84,51	8	11,27	3	4,22

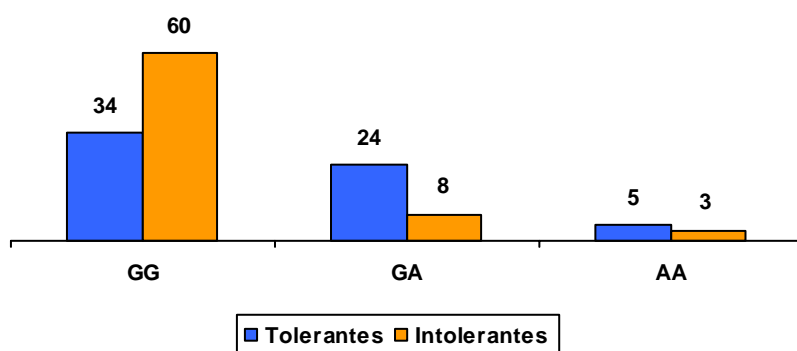


Figura 4.21. Correlación entre el fenotipo de tolerancia/intolerancia a la lactosa y el genotipo G/A-22018

En la tabla 4.36, analizando el polimorfismo G/A-22018, observamos que en el caso de los niños con polimorfismo GG, asociado con la malabsorción, la mayoría fueron intolerantes (63,83%), mientras que los polimorfismos GA y AA, asociados con la absorción a la lactosa presentaron una proporción mayoritaria de tolerantes (75% y 62,5%, respectivamente).

Tabla 4.36. Distribución de la muestra de niños según los fenotipos de tolerancia/intolerancia y el genotipo G/A-22018 (%)

Fenotipo	Tolerantes	Intolerantes	Total (nº)
GG	36,17	63,83	94
GA	75	25	32
AA	62,5	37,5	8

4.1.7.4. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos, para diagnosticar la intolerancia a la lactosa

Los resultados finales de la evaluación del test genético para identificar los pacientes con **intolerancia a la lactosa** son los siguientes:

Tabla 4.37. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los *SNPs* C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos para diagnosticar la intolerancia a la lactosa

Parámetro (%)	CC (C/T-13910)	GG (G/A-22018)	GG + CC (juntos)
Sensibilidad	85,92	85,92	85,92
Especificidad	42,86	46,03	46,03
Valor predictivo positivo	62,89	63,83	63,83
Valor predictivo negativo	72,97	72,5	72,5

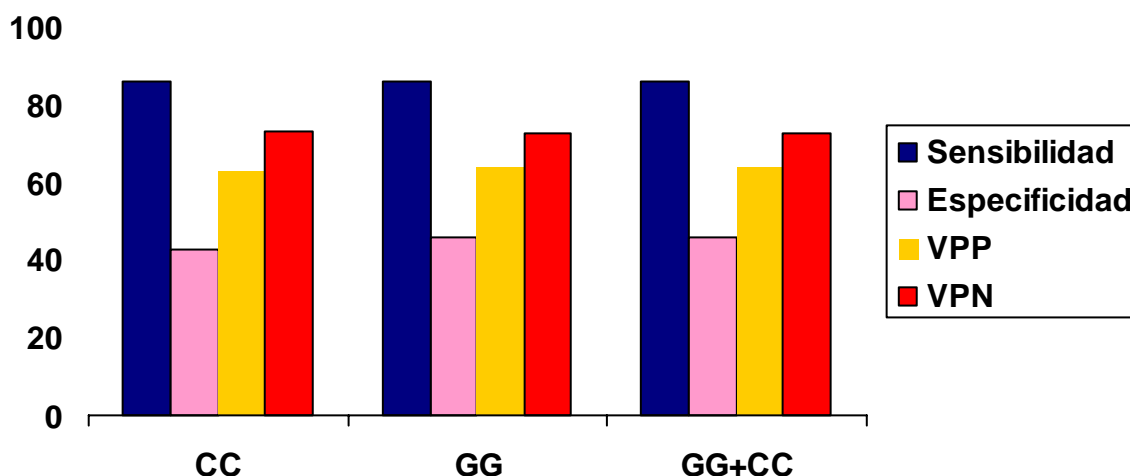


Figura 4.22. Comparación entre los parámetros de validez obtenidos utilizando los *SNPs* C/T-13910 y G/A-22018 por separado y juntos para diagnosticar la intolerancia a la lactosa

Como se observa en la tabla 4.37 y la figura 4.22, la sensibilidad para diagnosticar la intolerancia a la lactosa es la misma (85,92%) utilizando cualquiera de los dos polimorfismos C/T-13910, G/A-22018 o los dos juntos. La especificidad, sin embargo es mayor cuando se utiliza el polimorfismo G/A-22018 o los 2 polimorfismos juntos (46,03%) que cuando se utilizan el polimorfismo C/T-13910 (42,86%). Con el valor predictivo positivo sucede lo mismo, este siendo mayor cuando se utilizan el polimorfismo G/A-22018 o los 2 polimorfismos juntos (63,83%) que cuando se utilizan el polimorfismo C/T-13910 (62,89%). El mayor valor predictivo negativo se obtiene cuando se utiliza sólo el polimorfismo C/T-13910 (62,97%), en comparación el polimorfismo G/A-22018 o los 2 polimorfismos juntos (72,5%).

4.2. Controles gallegos

4.2.1. Estudio de las frecuencias alélicas de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en la población general gallega

Se realizó el genotipado de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en 81 muestras de ADN, de población general gallega (individuos con cuatro abuelos gallegos), procedentes del banco de ADN de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica compuesto de donantes sanos voluntarios que dieron su consentimiento para realizar análisis genéticos y moleculares con fines de investigación.

Tabla 4.38 Las frecuencias alélicas de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22019 en la población general gallega

Alelo	G/A- 22018	C/T - 13910
G	0,59	
A	0,41	
C		0,62
T		0,38

En la tabla 4.38 se observan las frecuencias alélicas para los dos *SNPs* estudiados: el alelo C (0,62) que supera el alelo T (0,38) del genotipo C/T-13910 y el alelo G (0,59) que supera el alelo A (0,41) del genotipo G/A-22018.

4.2.2. Perfil genotípico de la población general gallega

En el estudio realizado en las 81 muestras de ADN de las que no se conoce la condición de absorbente/malabsorbente y tomando en consideración los dos *SNPs* juntos (C/T-13910 y G/A-22018), se obtuvieron los siguientes genotipos (tabla 4.39):

Tabla 4.39. Distribución de la población general gallega según los dos polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 considerados juntos

GG+CC		AG+TC		AA+TT		AG+CC	
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
31	38,27	30	37,04	16	19,75	4	4,94

Se observa en la tabla 4.38 y la figura 4.23 un porcentaje de 38,27% de individuos con el genotipo GG + CC, que es el que se asocia con malabsorción.

En cuanto a los genotipos asociados con absorción: AG + TC, AA + TT, y AG + CC, se observan una distribución del 37,04%, 19,75% y 4,94% respectivamente, las cuales suman un total del 61,73%.

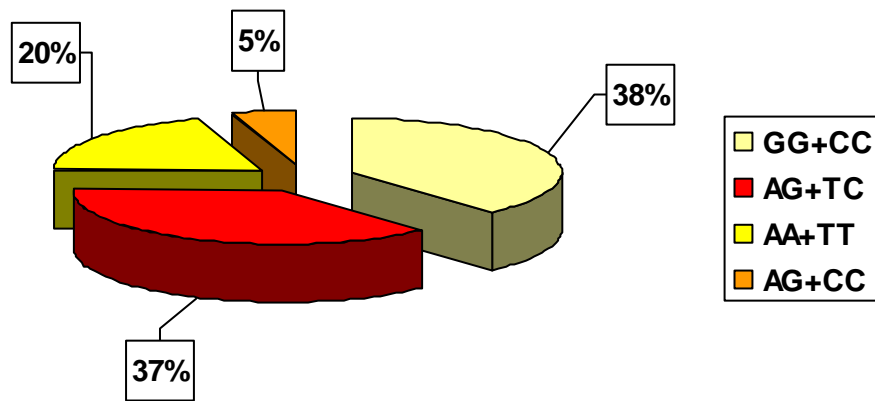


Figura 4.23. Distribución de la población general gallega según los dos polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 considerados juntos

Tomando en consideración solamente la variante C/T-13910, se observa en la tabla 4.40, que en la población general gallega predomina el homocigoto CC (43,21%), asociado con la malabsorción a la lactosa y que, en orden decreciente, los siguen el heterocigoto CT (37,04%) y TT (19,75%), los últimos dos siendo asociados con la absorción a la lactosa.

Tabla 4.40. Distribución de la población general gallega según el polimorfismo C/T-13910

CC		CT		TT	
N	%	N	%	N	%
35	43,21	30	37,04	16	19,75

4.3. Controles de otras nacionalidades

4.3.1. Perfil genotípico en las muestras de noruegos y griegos

Se realizó el estudio de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en muestras correspondientes a individuos procedentes de Noruega (Oslo) y de Grecia (Atenas), sin conocer su fenotipo para la malabsorción a la lactosa.

Tabla 4.41. Distribución de las muestras procedentes de Noruega y Grecia según los dos polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 considerados juntos

Nacionalidad	GG + CC		AG + TC		AA + TT		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Noruegos	3	6,66	15	33,3	27	60	45
Griegos	36	81,81	7	15,91	1	2,28	44

Como se observa en la tabla 4.41 y en la figura 4.24, la población general de 45 noruegos se distribuyó en 3 genotipos: 6,66% (3 personas) presentaron el fenotipo GG/CC, 33,33% (15 personas) el genotipo AG/TC y la mayoría de 60% (27 personas) presentaron el genotipo AA/TT.

La población general de 44 griegos se distribuyó en 3 genotipos: la mayoría de 82% (36 personas) presentaron el genotipo GG/CC, 16% (7 personas) el genotipo AG/TC y 2% (1 persona) el genotipo AA/TT.

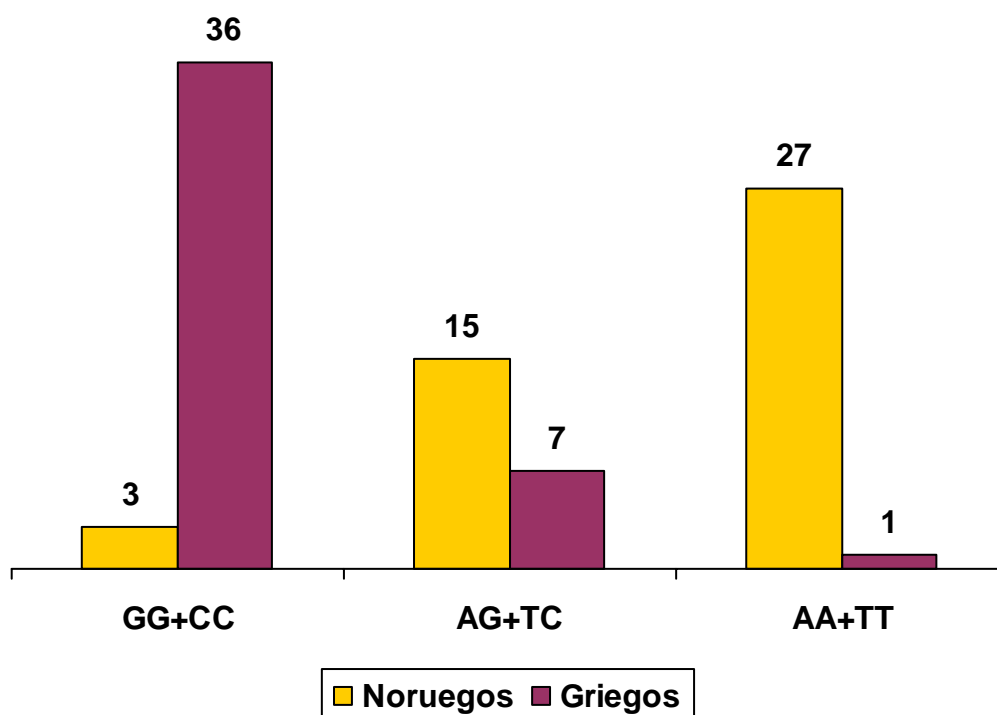


Figura 4.24. Distribución de las muestras procedentes de Noruega y Grecia según los dos polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 considerados juntos

4.3.2. Perfil genotípico en las muestras de Mozambique y Taiwán

Se realizó también el estudio del polimorfismo C/T-13910 en muestras procedentes de 2 poblaciones generales de Mozambique (57 muestras) y Taiwán (55 muestras).

Tabla 4.42. Distribución de las muestras procedentes de Mozambique y Taiwán según los dos polimorfismos C/T-13910

Nacionalidad	CC-13910		CT-13910		TT-13910		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Mozambique	56	98,25	1	1,75	0	0	57
Taiwan	55	100	0	0	0	0	55

Las 2 poblaciones procedentes de Mozambique y Taiwán, tal como se observa de la tabla 4.42 y la figura 4.25, presentan un patrón genético similar de malabsorción a la lactosa, con una gran prevalencia del genotipo CC, de 98,25% y 100%, respectivamente. No se encontró ningún homocigoto TT en las muestras estudiadas.

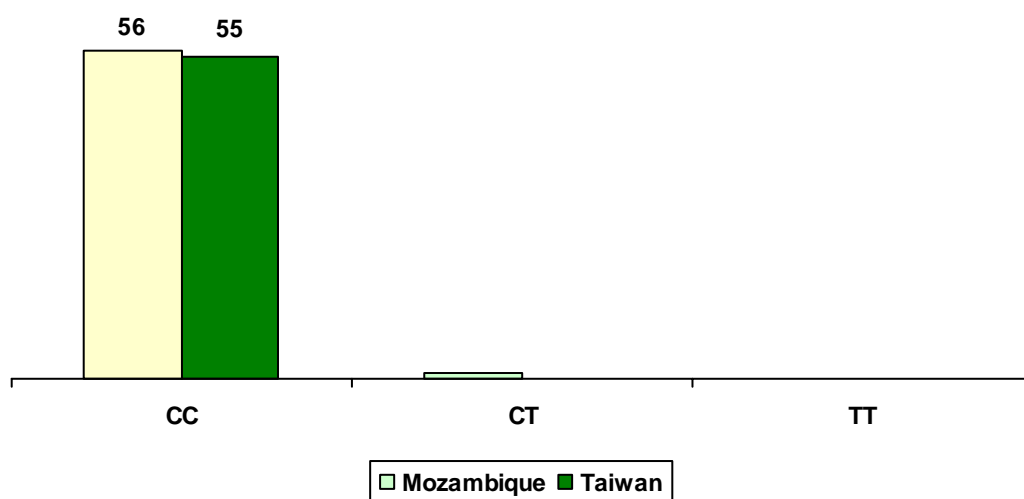


Figura 4.25. Distribución de las muestras procedentes de Noruega y Grecia según los dos polimorfismos C/T-13910

DISCUSIÓN

5.1. Discusión sobre la prevalencia de la malabsorción a la lactosa en Galicia

El estudio previo que realizamos en el año 2003, sobre la incidencia de la malabsorción a la lactosa en la población pediátrica gallega, confirmó la previsión que teníamos sobre la incidencia en Galicia, ya que esta región, por una parte está situada geográficamente en el sur de Europa, lo que favorecería la alta prevalencia del déficit enzimático, pero por otro lado es una región tradicionalmente ganadera, con un clima de alta pluviometría que permite pocas horas de sol, por lo que los niveles de vitamina D son relativamente bajos y se hace necesario un mayor aporte de calcio que favorecería la persistencia de la actividad enzimática.

La prevalencia de las alteraciones del metabolismo de la lactosa con la sobrecarga de la lactosa, medidas con el test de hidrógeno espirado en los 362 niños que componían la muestra inicial, fue de 29% (24,6% malabsorbentes y 4,4% deficientes absorbentes), cifra similar a la encontrada en Grecia (38-45%), por Spanidou y Kanaghinis, en Italia (18-52%) por Bianca y Cavalli-Sforza y en Francia (37-47%) por Cuddewek y Tordjman. Por otra parte, nuestras cifras de prevalencia de la malabsorción a la lactosa son más bajas que las halladas en las islas mediterráneas, según los estudios de Ladas en Chipre, donde se encontraba una incidencia de 75% y de Burgio en Sicilia, que la situaba en el 71%. Sin embargo, nuestras cifras son superiores a las encontradas en el norte de Europa, donde la malabsorción a la lactosa oscila entre 0-17%, presentando una de las incidencias más bajas en Holanda, entre 0-2%.

Con respecto a los trabajos realizados en España sobre la incidencia de la malabsorción a la lactosa, el primero fue Peña y col. que estimaron en adultos, mediante el test de tolerancia de la lactosa, una incidencia del 18,8%. En 1975, Vázquez y col. realizaron un estudio multicéntrico en 715 personas de todas las edades, procedentes de Madrid, Andalucía, Extremadura, País Vasco y Galicia y utilizando, al igual que Peña, el test de tolerancia de lactosa, encontraron una incidencia en la edad adulta de 14,8%. Tormo e Infante llevaron a cabo en 1987 el primer trabajo utilizando el test de hidrógeno espirado, en 32 niños de 4 a 11 años, con una sobrecarga de lactosa de 2g/kg peso y encontraron 46,9% de malabsorbentes. En 1990, Escribano Subías publica una incidencia estimada en la población con la sobrecarga de lactosa, de 30,2%. R. Leis Trabazo encuentra en 1992, con el motivo de su tesis doctoral, sobre la “incidencia de las alteraciones del metabolismo de la lactosa en la población de Galicia”, una incidencia estimada en 850 personas de la población general de 38,4%.

Por lo tanto, nuestras cifras de malabsorción a la lactosa son similares a las encontradas previamente en Galicia, en Aragón, e inferiores a las catalanas, pero superiores a las publicadas por Peña y Vázquez, aunque pudiera ser que las técnicas empleadas (el test de tolerancia a la lactosa y el test de hidrógeno espirado) y las dosis de lactosa administradas causaran las diferencias. Es decir, estas diferencias pueden ser debidas a factores técnicos o a diferencias entre los grupos estudiados.

5.2. Discusión sobre los resultados del test genético en comparación con el BH₂T, para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en la muestra de 134 niños genotipados

En nuestro estudio encontramos que en los pacientes con sospecha de hipolactasia, un simple test de sangre es suficiente para establecer el diagnóstico de hipolactasia de tipo adulto con una alta sensibilidad y especificidad. Estudiamos dos variantes de ADN identificadas en el año 2002 por Enattah et col., que demostraron una asociación completa de la variante C/T-13910 (c.1993+327C) o casi completa de la variante G/A-22018 (c.1438+117G) con la hipolactasia de tipo adulto, en una cohorte grande de pacientes con la hipolactasia de tipo adulto ya establecida por el BH₂T (Enattah-2002).

De acuerdo con los datos obtenidos por otros autores, nosotros observamos una alta correlación entre los resultados del BH₂T y el genotipado de la variante c.1993+327C, con una alta sensibilidad (100%), especificidad (75,5%), valor predictivo positivo (87,6%) y valor predictivo negativo (100%).

En el año 2005, Büning et col. (Büning-2005) incluyeron en su estudio 166 pacientes (101 mujeres y 65 varones, rango de edad entre 7-77 años), todos de origen caucásico y compararon el BH₂T con el test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa, utilizando las dos variantes C/T-13910 y G/A-22018. Tomando en consideración la primera variante C/T-13910 (genotipo CC), ellos encontraron los siguientes valores para los parámetros de: sensibilidad 91,4%, especificidad 96%, valor predictivo positivo 98,1% y valor predictivo negativo 82,8%. En cuanto a la segunda variante, G/A-22018 (genotipo GG), los resultados fueron los siguientes: sensibilidad 88,8%, especificidad 96%, valor predictivo positivo 98,1% y valor predictivo negativo 78,7%.

En el mismo año, Högenauer *et al.* (Högenauer 2005) estudiaron 123 pacientes caucásicos (43 varones y 80 mujeres, con la media de la edad de 42 años y el rango de edad entre 18-74 años), todos de origen caucásico (119 de descendencia austriaca). Estos autores calcularon los siguientes parámetros para la no persistencia de la lactasa, utilizando solamente la variante C/T-13910 (genotipo CC): la sensibilidad de 75%, la especificidad de 99%, el valor predictivo positivo de 97% y el valor predictivo negativo de 86%.

Los resultados de estos dos estudios que compararon el test de hidrógeno espirado con el test genético que utiliza las mismas variantes que nosotros, C/T-13910 y G/A-22018, se presentan en las tablas 5.1 y 5.2 y las figuras 5.1 y 5.2. Se observa que la sensibilidad (100%) y el valor predictivo negativo (100%) obtenidos en nuestro estudio fueron superiores a los valores de otros dos estudios (op.cit.) para los dos *SNPs*, C/T-13910 y G/A-22018. Sin embargo, la especificidad (75,5%) y el valor predictivo positivo (87,6%) fueron más bajos que en los estudios de Büning y Högenauer (op.cit.).

Tabla 5.1. Comparación entre los resultados del BH₂T con el test genético (C/T-13910) (%)

Autores	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Presente estudio	100	75,5	87,6	100
Büning (2005)	91,4	96	98,1	82,8
Högenauer(2005)	75	99	97	86

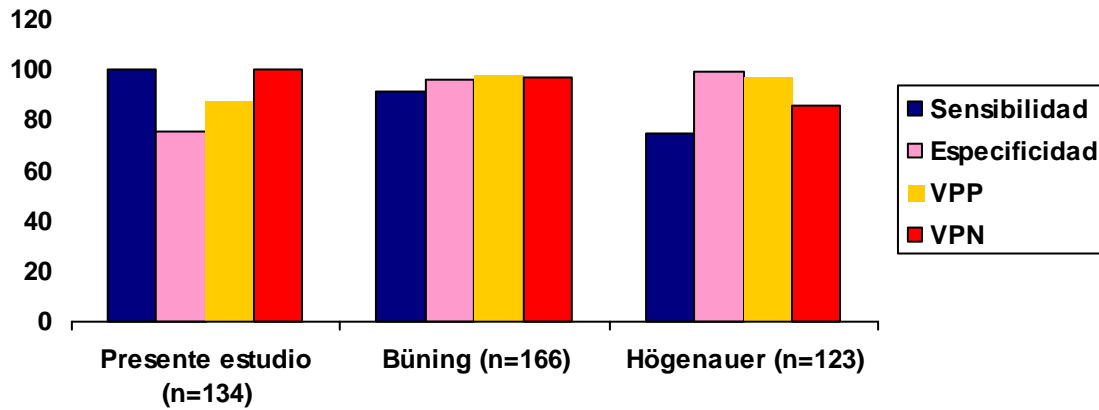


Figura 5.1. Comparación entre los resultados del BH₂T con el test genético (C/T-13910) (%)

De acuerdo con los hallazgos de Büning (op. cit.), en nuestro estudio, la variante C/T-13910 mostró una sensibilidad más alta (100%), en comparación con la variante G/A-22018 (97,6%).

Tabla 5.2. Comparación entre los resultados del BH₂T con el test genético (C/T-13910+G/A-22018) (%)

Autores	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Presente estudio	97,6	77,5	88,3	95
Büning (2005)	88,8	96	98,1	78,7

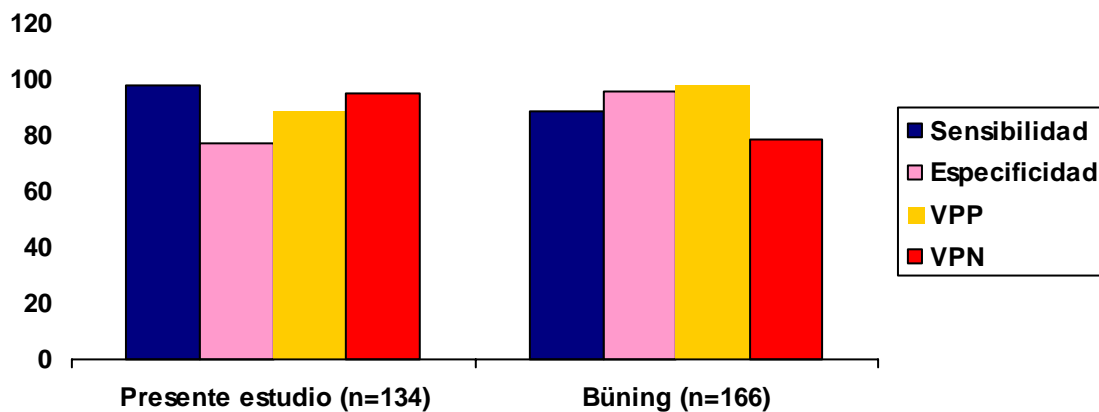


Figura 5.2. Comparación entre los resultados del BH₂T con el test genético (C/T-13910G/A-22018) (%)

Otros autores vieneses (Gugatschka 2005) encontraron también una alta correlación entre el genotipado de la variante C/T-13910 y el BH₂T (análisis de chi-cuadrado $r=0,82$; $p=0,001$). Ellos estudiaron una muestra de 51 hombres caucásicos no relacionados entre ellos, que aceptaron participar en el test genético y después en el BH₂T y en el test de tolerancia a la

lactosa. Encontraron que 90% de todos los individuos que presentaron el genotipo CC, asociado con la malabsorción a la lactasa, tuvieron un BH₂T positivo y que sólo 4,8% de los individuos con genotipo TT, asociado con la absorción a la lactosa, tuvieron un BH₂T positivo. De todos los individuos con el BH₂T positivo, un porcentaje muy grande, de 96,4% fueron homocigotos CC. Estos autores, basándose en la alta especificidad del genotipado LCT y de acuerdo con la alta tasa de resultados congruentes, sugirieron que el test genético podría reemplazar los dos tests indirectos estudiados, dado que es más barato (estimaron que el BH₂T era dos veces más caro que el test genético) y más conveniente (un examen único en la vida).

Swallow *et al.* (2003-op. cit.) encontraron también un alto nivel de asociación del *SNP* C/T-14 kb con el fenotipo de persistencia de la lactasa en los finlandeses y otros grupos poblacionales. Este marcador se demostró claramente, en su opinión, como un candidato mucho mejor para el diagnóstico de la malabsorción que cualquier otro marcador testado, incluido el *SNP* G/A-22 kb.

La tabla 5.4 (basada en los datos de Swallow-2003) muestra los genotipos CT-14 kb en los individuos con persistencia o no persistencia de la lactasa de descendencia norte europea (Reino Unido), Finlandia, sur europea (residentes en Italia y en Reino Unido), y de India (residentes en Reino Unido). En la tabla 5.4 incluimos también las 134 muestras de niños gallegos, fenotipadas en Galicia utilizando el BH₂T, mientras que la mayoría de las muestras finlandesas e indias se fenotiparon utilizando el test de tolerancia a la lactosa. Los resultados discrepantes se presentan en cursiva (es decir los individuos con persistencia de la lactasa que no presentan un alelo T). Las discrepancias observadas en la cohorte finlandesa e italiana reflejan, probablemente, las inexactitudes inherentes de los métodos utilizados para testar la tolerancia a la lactosa. Las discrepancias observadas en las muestras gallegas se discutirán en el capítulo 5.3.

Tabla 5.4. Los genotipos CT-14 kb en los individuos persistentes o no persistentes de descendencia norte europea (UK), Finlandia, sur europea (residentes en Italia y en UK), Galicia e India (residentes en UK). Tabla transformada a partir de los datos de Swallow (2003)

		Estatus		TT		CT		CC	
Origen	Nº		Nº	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Norte europeo	37	Persistente	35	20	57,14	15	42,86	0	0
		No persistente	2	0	0	0	0	2	100
Finlandés	41	Persistente	17	5	29,41	11	64,71	<i>I</i>	5,88
		No persistente	24	0	0	0	0	24	100
Galicia	134	Persistente	49	8	16,33	29	59,18	<i>I2</i>	24,49
		No persistente	85	0	0	0	0	85	100
Sur europeo	41	Persistente	14	0	0	12	85,71	<i>2</i>	14,29
		No persistente	27	0	0	0	0	27	100
Indios	12	Persistente	6	2	33,33	4	66,67	0	0
		No persistente	6	0	0	0	0	6	100

En conclusión, a pesar de los valores tan altos obtenidos para la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, que permiten utilizar el test genético descrito para el diagnóstico de la malabsorción a la lactosa, nosotros no fuimos capaces de confirmar en la población gallega una correlación perfecta entre los *SNPs* testados y el fenotipo de malabsorción a la lactosa utilizando el BH₂T, así como se había sugerido anteriormente en los estudios realizados en sujetos finlandeses, utilizando las biopsias intestinales en vez del BH₂T, para el diagnóstico de los fenotipos de persistencia/no persistencia de la lactasa (Enattah-2002).

Esta diferencia puede tener varias explicaciones. En el estudio presente, el análisis genético para la no persistencia de la lactasa se comparó con el BH₂T, que es un test indirecto para detectar la presencia de la no persistencia de la lactasa. La razón para utilizar el BH₂T en este estudio es que este test es el estándar clínico de oro para el diagnóstico de la no persistencia de la lactasa en la mayoría de los centros. La medición directa de la actividad de la lactasa por medio de las biopsias intestinales exige un procedimiento invasivo para obtener el tejido intestinal y se utiliza sobre todo con fines de investigación. Aún más, la medición de la actividad lactásica en las biopsias intestinales no puede evaluar si un paciente es sintomático tras la ingestión de lactosa (intolerante a la lactosa). El *background* fisiológico para el test BH₂T es el metabolismo bacteriano de la lactosa malabsorbida hasta el hidrógeno, que se absorbe por la mucosa colónica y se mide en el aire espirado. Estudios previos que compararon el BH₂T con la actividad lactásica en las biopsias intestinales encontraron resultados diferentes con respecto a la sensibilidad y a la especificidad. En un estudio la sensibilidad y la especificidad fueron de 100% (Newcomer-1975), mientras que en otro estudio utilizando un protocolo diferente para el BH₂T, se encontró una sensibilidad de solo 69% y una especificidad de 96% (Arola-1988).

Otra posible razón para la discrepancia en los resultados es la heterogeneidad genética entre nuestra población y la población finlandesa estudiada por Enattah et al. (op. cit.). Todos los pacientes con resultados discrepantes en los tests genéticos realizados por nosotros, fueron de descendencia gallega. La selección de los pacientes podría haber influido también los resultados.

En este estudio no testamos la actividad lactásica en las biopsias intestinales de los pacientes. Por consiguiente, no pudimos distinguir si los resultados discrepantes discutidos aquí se debieron a la hipolactasia o a otros factores que influyen en la digestión de la lactosa.

5.3. Descripción de los casos con resultados discrepantes entre el test ADN y el BH₂T en el diagnóstico de la malabsorción de la lactosa, en la muestra de 134 genotipados

Mientras que el test genético ofrece una respuesta clara si/no, la interpretación del BH₂T depende del nivel de corte. Sin embargo, solo 4 de los 9 pacientes con resultados discrepantes tuvieron un aumento del pico de H₂ suficientemente cerca del nivel de corte de 20 ppm. Como consecuencia, un cambio en el nivel de corte del BH₂T no tendría un impacto mayor en la correlación entre los resultados del test ADN y el BH₂T. Estos resultados se explican también sabiendo que los métodos convencionales de diagnóstico para la malabsorción a la lactosa, así como el test de hidrógeno espirado, tienen un porcentaje de aproximadamente un 5-20% de falsos-negativos, debido a la no-excreción de hidrógeno. La sensibilidad de diagnóstico del test de tolerancia a la lactosa es aproximadamente igual (Hammer-1996).

Probablemente en los casos presentados, los niños conservaban todavía en el momento de efectuar el BH₂T un nivel de lactasa suficiente para metabolizar la lactosa, a pesar de su genotipo GG + CC, relacionado con la malabsorción. El rango de edad de estos niños fue de 2 a 11 años. En Galicia, la edad de la aparición del déficit de lactasa se considera que es a partir de los 6 años de edad (Leis-1992) y tres de los niños expuestos más adelante tienen las edades de: 2, 3, 6 años. Es posible, teóricamente, que el declive adulto en los niveles de lactasa intestinal, en los otros dos pacientes de 9 y 11 años, fuera retrasado y que estos pacientes desarrollaran la hipolactasia más tarde en la vida.

Tres niños de los 87 que presentaron malabsorción en el primer BH₂T (test positivo), en el segundo BH₂T presentaron un incremento de $10 \text{ ppm} < \text{H}_2 < 20 \text{ ppm}$ y se interpretaron como deficientes absorbentes. Dos de ellos fueron tolerantes y uno presentó síntomas después de la sobrecarga de lactosa. Estos tres niños fueron heterocigotos AG/TC, es decir el análisis de ADN sugirió la persistencia de la lactasa.

Existen tres explicaciones probables para estos resultados discrepantes. Se encontró que los pacientes eran heterocigotos para el alelo C y para el alelo G. En un estudio previo se encontró que los heterocigotos con un genotipo CT tenían aproximadamente la mitad de la actividad lactásica intestinal, en comparación con los sujetos con el homocigoto TT (Kuokkanen-2003). Los 50 g de lactosa utilizados en este estudio para el test BH₂T, que es la dosis recomendada de costumbre (Saavedra-1989, Buller-1991), es bastante alta y representa la cantidad de lactosa contenida en 1 litro de leche. En consecuencia, es posible que en los sujetos heterocigotos con actividades más bajas de lactasa, grandes cantidades de lactosa sean malabsorbidas, mientras que se podrían tolerar cantidades más pequeñas de lactosa. Queda para ser evaluado si dosis más bajas de lactosa, como 20 g por ejemplo, que son las recomendadas

por algunos autores en el BH₂T (DiStefano-2002), influenciarían la correlación entre el BH₂T y el test de ADN.

En segundo lugar, otros factores, como el tránsito intestinal acelerado, podrían haber contribuido a la malabsorción a la lactosa y a la intolerancia en estos pacientes, disminuyendo el tiempo de contacto con la mucosa intestinal, a pesar de la actividad lactásica intestinal normal. Sin embargo, el tiempo de tránsito intestinal se tiene que interpretar con cautela.

En tercer lugar, en estos casos, los análisis de los fenotipos podrían revelar otras enfermedades gastrointestinales, sospechando que la hipolactasia podría ser de causa secundaria. No es el caso de los tres niños mencionados anteriormente, pero en pacientes con hipolactasia de causa secundaria se tiene que empezar tratando la enfermedad subyacente y después se pueden probar los productos con contenido en lactosa, cuando la enfermedad está en remisión. Por otro lado, a muchos de los pacientes con una sospecha de hipolactasia secundaria causada por una enfermedad gastrointestinal primaria, como sería la enfermedad de Crohn o la enfermedad celíaca, se les recomienda que intenten probar los productos con lactosa otra vez, cuando la enfermedad primaria está en remisión, pero el genotipado los identifica como sufriendo de la hipolactasia de tipo adulto (Buning-2003).

En los pacientes que quedan, el mecanismo que conduce a la hipolactasia de tipo adulto se puede solamente especular. Se vieron resultados positivos del BH₂T en los casos de sobrecrecimiento bacteriano. El ejercicio (Payne-1983), el uso previo de aminosalicilatos (Rosenthal-1983) y el tabaco (Flatz-1982) llevan también a resultados positivos, pero se excluyeron en nuestros pacientes. Otra posibilidad sería que la enfermedad subyacente que afecta la mucosa intestinal no se había diagnosticado todavía o que factores no conocidos podrían producir la hipolactasia secundaria. Por último, así como había sugerido Poulter et col., no podemos excluir que otra alteración genética diferente de las dos conocidas causara la hipolactasia de tipo adulto (Poulter-2003).

No hubo ningún niño malabsorbente (BH₂T positivo) que presentara los genotipos relacionados con la absorción.

5.4. Discusión sobre los resultados del test genético para diagnosticar la hipolactasia de tipo adulto en función de la edad

Dado que la *down-regulación* de la actividad de la lactasa es dependiente de la edad, se tiene que prestar una atención específica a la interpretación de los resultados del genotipado en los niños (Järvela-2005). La reciente correlación entre el genotipo C/T-13910 y la actividad de la lactasa y el ratio lactasa/sucrasa en los pacientes pediátricos, demostró que la *down-regulation* de la actividad de la lactasa ocurre entre los 5 y 12 años de edad (Rasinperä-2004). Se realizaron comparaciones entre diferentes poblaciones sobre la edad de aparición de la hipolactasia de tipo adulto y se vio que en la población “negra” se manifiesta entre los 1-8 años, mientras que en la población blanca los niveles bajos de lactasa se ven raramente antes de los 5 años (Sahi-1972, Keuch-1969, Simoons-1980, Welsh-1978, Wang-1998); es más, en la población finlandesa llegan incluso hasta los 20 años (Sahi-1972).

En Galicia, la pérdida de actividad lactásica suficiente para provocar intolerancia a la lactosa se inicia a partir de los 6 años de edad, manteniéndose posteriormente unos porcentajes de alteración del metabolismo de la lactosa sin diferencias significativas a lo largo del todo el ciclo de la vida (Leis-1992).

En nuestro estudio, los niños incluidos en la muestra del 2004-2005, de la cual se obtuvieron 134 genotipos, presentaron un rango de edad entre 2 y 18 años. Esta muestra se ha clasificado en 3 grupos de edad (2-5 años, 6-11 años, >12 años) y los resultados obtenidos para la validez de la prueba genética en cada grupo de edad se han comparado con los resultados de otro estudio previo (Rasinperä-2004). Rasinperä (op. cit.) estudió 329 niños, de los cuales 252 eran finlandeses (rango de edad entre 0,6-20,2 años, 127 mujeres), 65 de origen africano (rango de edad entre 0,1-15,6 años, 34 mujeres) y 12 niños clasificados como “otros blancos” (rango de edad 1,9-10,9 años, 6 mujeres).

La diferencia entre nuestra investigación y la de Rasinperä reside en el método empleado para diagnosticar los fenotipos de absorción/malabsorción a la lactosa. Mientras que nosotros utilizamos el BH₂T, Rasinperä utilizó las biopsias intestinales para medir la actividad de la lactasa y el ratio lactasa/sucrasa.

En la tabla 5.3 se observa que Rasinperä estudió un número más grande de niños que nosotros (329 vs. 134), diferencia que está muy marcada en el grupo de edad de 2-5 años (109 vs. 11 niños). En la tabla 5.3 y las figuras 5.3, 5.4 y 5.5 se observa, también que, en nuestro estudio, la **sensibilidad** de la prueba genética, utilizando la variante C/T-13910, es decir la probabilidad que para un sujeto malabsorbente se obtenga un resultado positivo en la prueba genética (el genotipo CC), es nula en el grupo de edad entre 2-5 años. Sin embargo, en los dos grupos de mayor edad, la sensibilidad es de 100%, es decir el test genético que utiliza el *SNP* C/T-13910, tiene la capacidad máxima de detectar la malabsorción. Todos los niños mayores de

6 años que obtuvieron un resultado positivo en la prueba de ADN (genotipo CC) fueron malabsorbentes.

Tabla 5.3. Comparación entre los resultados del test genético (variante C/T-13910) por grupos de edad

Parámetro (%)	2-5 años		6-11 años		>12 años	
	Presente estudio n=11	Rasinperä n=109	Presente estudio n=71	Rasinperä n=142	Presente estudio n=52	Rasinperä n=78
Sensibilidad	0	80,0	100	94,6	100	93,3
Especificidad	81,81	65,4	80,77	81,9	58,33	100
VPP	0	10,0	90	64,8	88,88	100
VPN	100	98,6	100	97,7	100	98,4

Los resultados obtenidos por nosotros fueron mejores que los obtenidos por Rasinperä *et al.* en los dos grupos de edad mayores de 6 años (100% frente a 94,6% para el grupo de 6 a 11 años y de 100% frente a 93,3%, para el grupo >12 años), sin embargo, en el grupo de edad de 2-5 años, el test genético no se podría utilizar según nuestros resultados, mientras que según Rasinperä, sí se puede utilizar, dada su alta sensibilidad, de 80%. Una explicación para esta diferencia podría ser el número demasiado pequeño de sujetos incorporados en nuestro estudio, en el grupo de 2-5 años (n=11), en el cual nosotros no encontramos ningún verdadero positivo. Otra posible explicación reside en el método diferente empleado para comparar los resultados del test genético. Rasinperä *et al.*, eligieron unos puntos de corte de 10 U/g proteína y no de 20 U/g (como prefieren otros autores) para la medición de la actividad lactásica y de 0,2 para el ratio L:S (lactasa:sucrasa). Entonces, estos autores consideraron positivos los valores de actividad lactásica <10 U/g proteína y el ratio L:S <0,2. Esto significa que la posibilidad de encontrar verdaderos positivos es más grande utilizando las biopsias intestinales, para medir la actividad lactásica, que utilizando el BH₂T, cuyo punto de corte se considera la espiración de 20 ppm de H₂ para un resultado positivo. En otras palabras, para que un niño sea enfermo (verdadero positivo), según el BH₂T, tiene que expirar más de 20 ppm H₂, mientras que en la medición de la actividad lactásica un niño positivo tiene que presentar menos de 10 U/g proteína. Por eso, hasta los 5 años es más fácil de obtener un resultado verdadero positivo midiendo la actividad lactásica que midiendo el hidrógeno espirado en el BH₂T.

En cuanto a la **especificidad** de la prueba genética, en nuestro estudio se observa que tiene el valor más alto encontrado en el grupo de edad de 2-5 años (81,81%) y que descende poco en el grupo de 6-11 años (80,77%) y mucho más en el grupo mayor de 12 años. Es decir, la probabilidad que para un niño absorbente, según el BH₂T se obtenga un resultado negativo en la prueba genética (los genotipos CT o TT), va disminuyendo con la edad. Estos resultados difieren de los resultados obtenidos por Rasinperä (op. cit.), donde la especificidad va aumentando con la edad (65,4% en los niños de 2-5 años, 81,9% en los niños de 6-11 años y 100% en los niños mayores de 12 años). Una posible explicación se encontraría de nuevo en los

métodos diferentes que se emplearon, nosotros comparando el test genético con el BH₂T, que produce más falsos positivos, mientras que Rasinperä utilizó para la comparación con el test genético la medición de la actividad lactásica en las muestras de biopsias intestinales, método más fiable y que genera menos falsos positivos.

El **valor predictivo positivo**, es decir la probabilidad de ser malabsorbente si se obtiene un resultado positivo en el test genético (el genotipo CC) tuvo un valor nulo en nuestro grupo de edad de 2-5 años. En el estudio realizado por Rasinperä et col., el valor fue también muy bajo (10%), pero más grande que el nuestro, debido a la presencia de verdaderos positivos, así como hemos analizado antes. En el grupo de 6-11 años, nosotros obtuvimos un valor mayor de VPP (90%) en comparación con Rasinperä (64,8%), mientras que en el grupo de >12 años ocurrió al revés, el resultado obtenido por nosotros siendo inferior al obtenido por Rasinperä (88,88% vs. 100%).

El **valor predictivo negativo**, es decir la probabilidad de que un niño con resultado negativo en la prueba genética (los genotipos CT o TT) sea realmente sano (absorbente), fue de 100% en todos los grupos de edad de nuestra muestra. Estos valores superaron los valores obtenidos por Rasinperä, que también fueron muy grandes (98,6%, 97,7% y 98,4%, respectivamente).

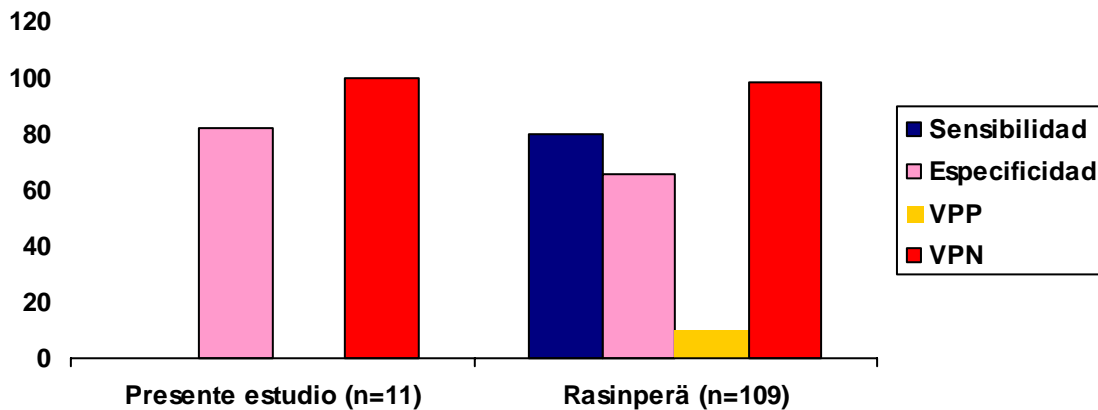


Figura 5.3. Comparación entre los resultados del test genético (variante C/T-13910) para el grupo de edad de 2-5 años

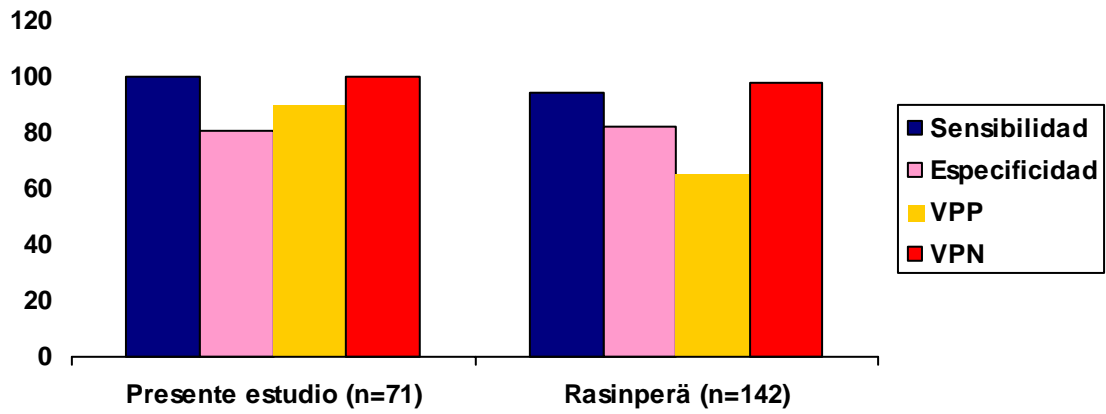


Figura 5.4. Comparación entre los resultados del test genético (variante C/T-13910) para el grupo de edad de 6-11 años

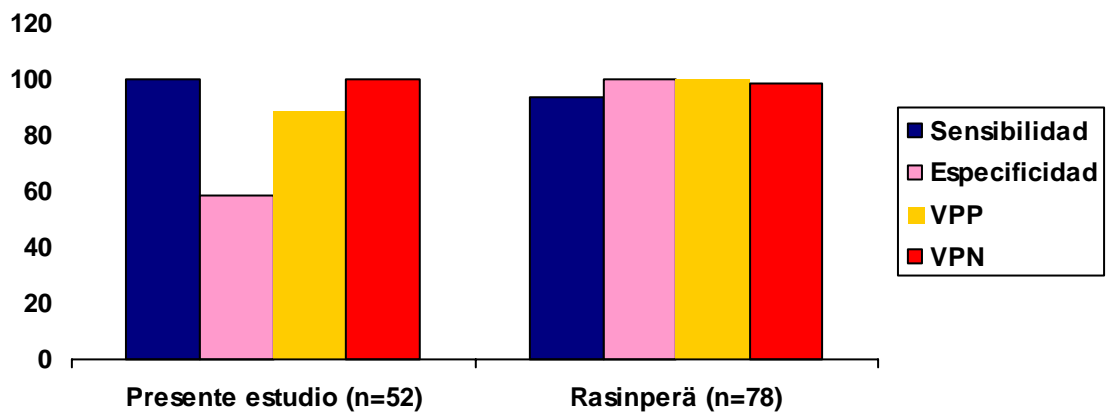


Figura 5.5. Comparación entre los resultados del test genético (variante C/T-13910) para el grupo de edad >12 años

5.5. Utilidad del test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en la población general gallega, en comparación con otros grupos poblacionales

5.5.1. El test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en la población general gallega

En el estudio realizado con 81 muestras de ADN de la población general gallega, en cuyo caso no se conocían los fenotipos de persistencia/no persistencia de la lactasa y utilizando las dos variantes C/T-13910 y G/A-22018 asociadas con la malabsorción a la lactosa, se obtuvo un porcentaje de 38,27% de individuos con el genotipo GG + CC, que es el que se asocia con la malabsorción.

Este porcentaje es comparable con el porcentaje estimado de personas malabsorbentes en estudios de prevalencia realizados previamente en Galicia, sobre grandes poblaciones. Leis estudió una población de 850 personas sanas gallegas (con rango de edad entre 3 y 80 años, 453 mujeres) y encontró un porcentaje de 38,4% de personas con alteraciones del metabolismo de la lactosa tras la sobrecarga con 2 g de lactosa/Kg peso (deficiente absorbentes, malabsorbentes e intolerantes a la lactosa). (Leis-1992).

Esta frecuencia es bastante más alta que la frecuencia de 24,6%, encontrada por nosotros en la muestra de 362 niños estudiada en el 2003, una muestra seleccionada de niños que acudían a la consulta de nutrición por síntomas gastrointestinales y con una probabilidad más alta de tener una causa secundaria de hipolactasia de tipo adulto. En estos últimos dos estudios realizados en Galicia, el diagnóstico se basó en el BH₂T y la comparación entre las dos pruebas (genética y el BH₂T) podría indicar también una mayor sensibilidad del genotipado en comparación con el BH₂T. A la misma conclusión llegaron unos investigadores alemanes (Büning-2005), que encontraron una frecuencia de 21,4% para las dos variantes de ADN asociadas con la hipolactasia de tipo adulto, que es ligeramente más alta que la frecuencia reportada en Alemania de 15% de hipolactasia, un diagnóstico basado en el BH₂T (Flatz-1982).

En cuanto a los genotipos asociados con la absorción a la lactosa (AG + TC, AA + TT, AG + CC), en la población general gallega se ha observado una distribución del 37,04%, 19,75% y 4,94% respectivamente, las cuales suman un total del 61,73% de la población, cifra que se corresponde con la prevalencia de la persistencia de la lactasa en Galicia.

Tomando en consideración solamente la variante C/T-13910, en la población general gallega predomina el homocigoto CC (43,21%), asociado con la malabsorción a la lactosa y en orden decreciente lo siguen el heterocigoto CT (37,04%) y el homocigoto TT (19,75%), los últimos dos asociados con la absorción a la lactosa.

5.5.2. El test genético para diagnosticar la malabsorción a la lactosa en muestras de Noruega, Grecia, Mozambique y Taiwán utilizando las dos variantes C/T-13910 y G/A-22018

Se realizó el estudio de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en muestras correspondientes a individuos procedentes de Noruega y de Grecia, sin conocer su fenotipo para la malabsorción a la lactosa. Las dos poblaciones procedentes de Noruega y Grecia presentan un patrón genético distinto para la malabsorción a la lactosa, en conformidad con su distribución geográfica diferente.

Los **noruegos**, población del norte de Europa, presentan en su mayoría el genotipo AA/TT (60%) y el genotipo AG/TC (33,3%), asociados con absorción a la lactosa, es decir un total de 93,3% fueron absorbentes. Por otra parte, los **griegos**, población del sur de Europa, presentan la mayoría el genotipo GG/CC, asociado con la malabsorción a la lactosa (81,6%).

Se realizó también el estudio del polimorfismo C/T-13910 en muestras procedentes de 2 poblaciones generales de **Mozambique** (57 muestras) y **Taiwán** (55 muestras), que presentan un patrón genético similar de malabsorción a la lactosa, con una gran prevalencia del genotipo CC, de 98,25% y 100%, respectivamente.

Estos resultados se compararon con los datos obtenidos por Enattah et col. (2002) (op. cit.) y Swallow et col. (2003) (op. cit.) en varias poblaciones, en las cuales se estudió la variante C/T-13910. En la tabla 5.4 se observa que la frecuencia del genotipo TT, asociado con el fenotipo de persistencia a la lactasa tiene el valor más alto en Noruega (60%), seguido de los estadounidenses de origen norte europeo (56,52%), los británicos de origen norte europeo (54,05%), los finlandeses (34,33%), los franceses del norte de Francia (20,83%), los gallegos (19,75%), los habitantes del norte de India (16,67%), los afro-americanos de los EEUU (2,27%) y los griegos 2,27%. En los italianos del sur de Italia y en las poblaciones de Mozambique y Taiwán no se encontró ningún sujeto con el genotipo TT.

En cuanto al genotipo CT, asociado también con la absorción a la lactosa, se encontró la frecuencia más grande en los franceses del norte de Francia (50%), seguidos de los finlandeses (47,55%), de los norte europeos del Reino Unido (40,54%), de los gallegos (37,04%), de los americanos de descendencia norte europea (35,87%), de los noruegos y de la población del norte de India en proporciones iguales (33,33), de los italianos del sur de Italia (27,5%), de los griegos (15,91%), de los afro-americanos de EEUU (15,62%) y de la población de Mozambique (1,75%). Entre los taiwaneses no se encontró ningún sujeto heterocigoto CT.

El homocigoto CC, asociado con el fenotipo de no persistencia de la lactasa, se encontró en proporción máxima (100%) en la población de Taiwán y después, en orden decreciente en la población de Mozambique (98,25%), en los griegos (81,82%), en los afro-americanos de EEUU (79,17%), de los italianos del sur de Italia (72,5%), de los habitantes del norte de India

(50%), de los gallegos (43,21%), de los franceses del norte de Francia (29,17%), de los finlandeses (18,12%), de los estadounidenses de origen norte europeo (7,61%), de los noruegos (6,67%) y de los británicos de origen norte europeo (5,41%).

En conclusión, se observa que la prevalencia de los genotipos de la variante C/T-13910 respecta el gradiente geográfico norte-sur observado en la prevalencia del fenotipo de persistencia/no persistencia de la lactasa, el homocigoto CC, asociado con la no persistencia de la lactasa, encontrándose más en las latitudes nórdicas y los genotipos TT y CT, asociados con la persistencia de la lactasa más al sur.

En conclusión, las muestras de poblaciones noruegas, griegas, de Mozambique y Taiwán genotipadas en el presente estudio, confirman la distribución geográfica de la prevalencia de la hipolactasia de tipo adulto en el mundo.

Tabla 5.4. La frecuencia de los genotipos CT-14 kb en varias poblaciones
Tabla transformada a partir de los datos de Enattah (2002) y Swallow (2003)

Población	Fuentes	N total	TT		CT		CC	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
Noruega	Presente estudio	45	27	60	15	33,33	3	6,67
USA (N. europeos)	Enattah	92	52	56,52	33	35,87	7	7,61
UK (N. europeos)	Swallow	37	20	54,05	15	40,54	2	5,41
Finlandia	Enattah	938	322	34,33	446	47,55	170	18,12
Francia (Norte)	Swallow	24	5	20,83	12	50	7	29,17
Galicia	Presente estudio	81	16	19,75	30	37,04	35	43,21
Indios (Norte)	Swallow	12	2	16,67	4	33,33	6	50
USA (negros)	Enattah	96	5	5,21	15	15,62	76	79,17
Grecia	Presente estudio	44	1	2,27	7	15,91	36	81,82
Italia (Sur)	Swallow	40	0	0	11	27,5	29	72,5
Mozambique	Presente estudio	57	0	0	1	1,75	56	98,25
Taiwán	Presente estudio	55	0	0	0	0	55	100

5.6. Discusión sobre la validez del test genético para diagnosticar la intolerancia a la lactosa durante las 3 horas del BH₂T

El diagnóstico corriente de intolerancia a la lactosa consiste en la ingesta de 50 g de lactosa, el equivalente de 1 litro de leche de vaca, seguida de la medición del hidrógeno espirado durante 3 horas (Campbell-2001, Fauchi-1998, Srinivasan -1998, Joseph-1988, Duncan-2001). La gran ingesta de lactosa sobrepasa la lactasa restante en aquellos sujetos que pierden la lactasa después del destete y conduce inevitablemente a síntomas. No obstante, la aparición de síntomas después de la ingesta de 50 g de lactosa no significa que no se puede tolerar la leche. Incluso algunos sujetos control, sin antecedentes intestinales, presentan algunos síntomas después de la ingesta de 50 g de lactosa.

Hay cinco problemas en el diagnóstico corriente de la intolerancia a la lactosa:

- 1-Al test estándar le falta la sensibilidad, hecho empeorado por la falta de recomendación de que los síntomas se deben registrar de rutina durante el BH₂T y 48 horas después del test.
- 2-El test puede causar síntomas severos, que duran a veces varios días.
- 3-La intolerancia a algunos alimentos puede causar el síndrome del intestino irritable, con un largo rango de síntomas inexplicables que se añaden a los síntomas intestinales.
- 4-No todo el mundo conoce que la lactosa se añade a un gran número de alimentos y bebidas sin estar apuntadas en la etiqueta, cosa que genera el fracaso de diagnosticar la intolerancia a la lactosa cuando los síntomas ocurren después de la eliminación de los productos lácteos de la dieta (Campbell-2001, Matthews-2000;355, Matthews-2000; 356, Matthews-2004).
- 5-No se ha descrito hasta ahora un test genético de intolerancia a la lactosa.

El test de ADN, junto con el test de hidrógeno espirado, son argumentos para unos cambios importantes en la práctica clínica. Matthews (2004 op.cit.) recomienda medir el hidrógeno espirado durante 6 horas, porque esto aumenta la sensibilidad de diagnosticar la intolerancia a la lactosa desde 40% hasta 60%. Los síntomas se deberían evaluar hasta las 48 horas después de la ingesta de 50 g de lactosa, utilizando un cuestionario de síntomas auto-reportados. La falta de necesidad de un test de lactosa para los pacientes con el genotipo CC/GG, evita la aparición de unas reacciones severas en estas personas. Solamente los pacientes CT/GA y TT/AA deberían pasar por el test de hidrógeno espirado.

Hemos correlacionado dos polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 asociados fuertemente con la persistencia de la lactasa (Enattah-2002, Obermeyer-Pietsch-2004), con el test de hidrógeno espirado y con los síntomas intestinales y sistémicos inducidos después de la ingesta de lactosa en 134 niños, durante las primeras 3 horas después de la sobrecarga de lactosa. Los parámetros que determinan la validez de esta prueba para diagnosticar la intolerancia a la lactosa han sido inferiores a los encontrados en el caso del diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto.

La **sensibilidad** para diagnosticar la intolerancia a la lactosa es la misma (85,92%) utilizando cualquiera de los dos polimorfismos C/T-13910, G/A-22018 o los dos juntos, pero es inferior a la sensibilidad de diagnosticar la malabsorción a la lactosa (100% utilizando el genotipo C/T-13910, 97,6% el genotipo G/A-22018 o 94,7% utilizando los dos genotipos juntos).

La **especificidad** para diagnosticar la intolerancia a la lactosa es mayor cuando se utiliza el polimorfismo G/A-22018 o los 2 polimorfismos juntos (46,03%) que si se utiliza el polimorfismo C/T-13910 (42,86%), pero en cualquiera de los tres casos es inferior a la especificidad de diagnosticar la malabsorción a la lactosa (87,5% utilizando los dos genotipos juntos, 77,5% el genotipo G/A-22018 o 75,5% utilizando el genotipo C/T-13910).

Con el **valor predictivo positivo** para diagnosticar la intolerancia a la lactosa sucede lo mismo, este siendo mayor cuando se utilizan el polimorfismo G/A-22018 o los 2 polimorfismos juntos (63,83%) que si se utilizan el polimorfismo C/T-13910 (62,89%). En cualquiera de los tres supuestos mencionados, los valores de VPP son inferiores a los valores en el diagnóstico de la malabsorción a la lactosa: 94,7% utilizando los dos genotipos juntos, 88,3% el genotipo G/A-22018 o 87,6% utilizando el genotipo C/T-13910.

El mayor **valor predictivo negativo** para diagnosticar la intolerancia a la lactosa se obtiene cuando se utiliza sólo el polimorfismo C/T-13910 (62,97%), en comparación el polimorfismo G/A-22018 o los 2 polimorfismos juntos (72,5%). Estos valores son inferiores a los VPN en el diagnóstico de la malabsorción a la lactosa (100% utilizando el genotipo C/T-13910, 95% el genotipo G/A-22018 o 87,5% utilizando los dos genotipos juntos).

Otros autores consideran también que el análisis de ADN es una contribución importante en la investigación sobre la intolerancia a la lactosa, siendo necesario una redefinición de la intolerancia a la lactosa. Mathews (2004 op. cit.) recomienda medir el hidrógeno espirado durante 6 horas, porque esto aumenta la sensibilidad de diagnosticar la intolerancia a la lactosa desde 40% hasta 60%. Sus datos se basan en un estudio realizado en más de 300 adultos y niños, en los cuales encontró que 82% de los sujetos con el genotipo CT-13910/GA-22018 (41% del total) y 68% de los con el genotipo TT-13910/AA-22018 (41% del total) fueron intolerantes a la lactosa. Todos los pacientes con el genotipo CC-13910/GG-22018 (16% del total, un caso de CC-13910/GA-22018) fueron severamente intolerantes a la lactosa, teniendo un test de hidrógeno espirado >20 ppm H₂ a las seis horas y síntomas clínicos severos. Solamente 45% de los CT-13910/GA-22018 y 20% de los TT-13910/AA-22018 tuvieron niveles elevados de hidrógeno, que deberían ser medidas durante 6 horas y los síntomas intestinales y sistémicos durante 48 horas. En su estudio, el test de hidrógeno espirado tuvo un valor predictivo positivo de 95% a las seis horas, pero un valor predictivo negativo de sólo 34%. El diagnóstico definitivo de intolerancia a la lactosa necesita la eliminación de la dieta tanto de los productos lácteos como también de la lactosa “oculta”.

5.7. La interpretación del test genético para diagnosticar la hipolactasia de tipo adulto

Así como se ha descrito, el análisis de los genotipos para la detección de los polimorfismos de persistencia/no persistencia de la lactasa se ha ofrecido recientemente como una ayuda clínica en la evaluación de la intolerancia a la lactosa. Hay dos laboratorios en Finlandia que ofrecen un test diagnóstico de ADN (Hyks-Laboratoridiagnostiikka, Medix Laboratoriot) como una alternativa al test de tolerancia a la lactosa. Este test genético permite la determinación de la predisposición genética para la hipolactasia, pero no identifica definitivamente la hipolactasia como la causa de los síntomas de intolerancia a la lactosa.

En la figura 5.6 se presenta una propuesta de diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto.

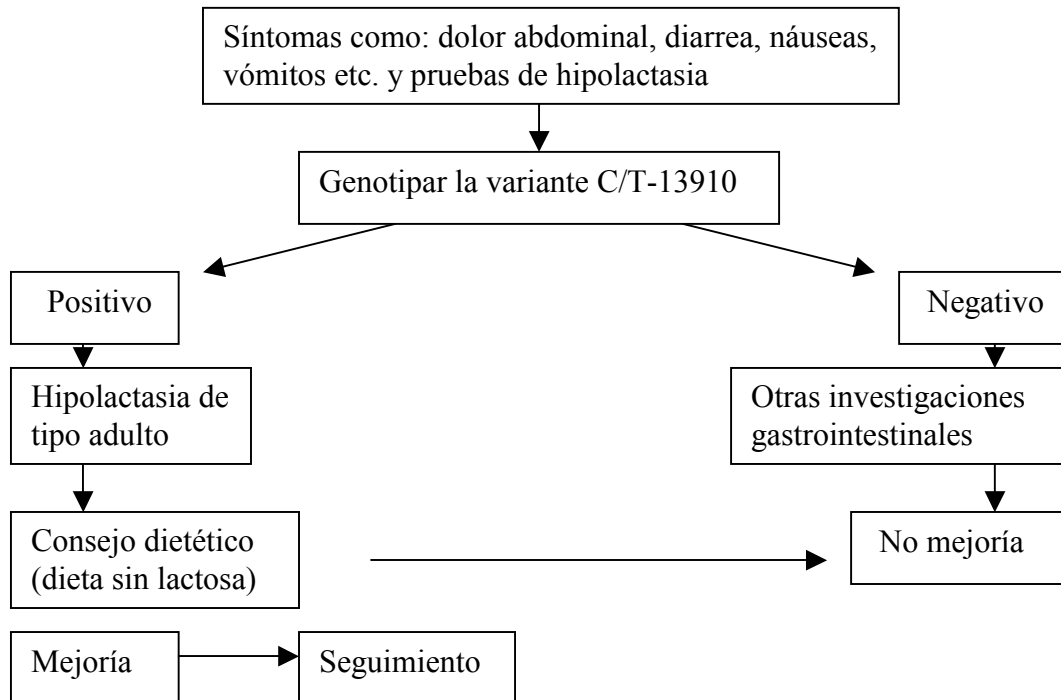


Figura 5.6. Esquema de diagnóstico para la hipolactasia de tipo adulto

5.7.1. La interpretación inapropiada de esta detección genética puede atribuir erróneamente los síntomas de intolerancia a la lactosa a la hipolactasia de tipo adulto, en individuos solamente predispuestos a esta condición (por ejemplo niños o adultos jóvenes) o que tienen también deficiencia secundaria a la lactosa. Esta mal interpretación podría tardar o impedir el diagnóstico de otras causas, más serias, de intolerancia a la lactosa, debidas a la deficiencia secundaria de lactasa (enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal o enteritis infecciosa). Además, el error de diagnóstico o un diagnóstico prematuro de intolerancia podría tener como resultado unas reducciones no necesarias del consumo de lácteos y de la ingesta de

calcio. Entonces, la detección genética de la hipolactasia asociada a la variante de ADN no se debería usar como el único criterio para determinar la etiología de la intolerancia a la lactosa (Sibley-2004).

5.7.2. El **uso potencialmente apropiado** de la detección genética sería de excluir la hipolactasia de tipo adulto como causa de los síntomas no-específicos de intolerancia a la lactosa (dolor abdominal, hinchazón, diarrea), en cuyos diagnósticos diferenciales podrían incluirse la enfermedad celíaca, el síndrome del intestino irritable y la enteritis infecciosa, entre otras. Por ejemplo, en un paciente que presenta síntomas de intolerancia, la detección del genotipo C/C-13910, asociado con la no persistencia de la lactasa, no demostraría que la hipolactasia es la causa de los síntomas del paciente, ni significaría necesariamente que el paciente ha desarrollado ya la hipolactasia. Sin embargo, la detección de los genotipos C/T-13910 o T/T-13910, asociados con la persistencia de la lactasa, excluirían esencialmente la deficiencia de la lactasa como la causa de los síntomas del paciente. La evaluación médica se dirigiría entonces a otros diagnósticos (Sibley-2004). En consecuencia, el resultado del test genético se debe de interpretar correctamente en cada paciente. (Järvelä-2005).

5.7.3. Las ventajas del test genético

1-Es posible realizar tests genéticos partiendo de 1-3 ml de sangre en EDTA, siendo beneficiosos para los pacientes y para el personal sanitario, dado que consume menos tiempo y es menos pesado (un vial de sangre venosa se puede enviar fácilmente al laboratorio, donde la técnica de genotipado puede ser automatizada).

2-Son coste-efectivos, en comparación con las pruebas tradicionales (el test de tolerancia a la lactosa, el BH₂T y la biopsia intestinal), siendo más barato (aproximadamente la mitad del coste del BH₂T).

3- No presenta los riesgos potenciales de las otras pruebas: no es invasivo (a diferencia de las biopsias intestinales), no provoca síntomas gastrointestinales ni sistémicos (a diferencia del BH₂T).

4-La interpretación de los resultados del genotipado no es ambigua y el test sólo se necesita hacerlo una vez en la vida (que puede ser en la primera visita), dado que sus resultados no varían en el tiempo (Järvelä-2005).

5-Se desarrollaron varios métodos para la detección de la variante C/T-13910 (Rasinperä-2004, Nilsson-2004, Herrinton-1995, Buning-2003, Rasinperä-2004).

6-El test genético de la hipolactasia de tipo adulto ofrece un instrumento más fiable en los pacientes adultos diabéticos cuyo metabolismo aberrante de la glucosa podría modificar el

resultado obtenido midiendo los niveles de glucosa con el test indirecto de tolerancia a la lactosa (Järvelä-2005).

7-Los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo son superiores a cualquiera de las otras pruebas utilizadas para el diagnóstico de la malabsorción a la lactosa.

5.7.4. Las desventajas del test genético

1-La interpretación del test genético todavía es una provocación en la práctica clínica, debido a la pobre correlación entre los síntomas y la actividad lactásica.

2-En los niños, el genotipado de la variante C/T-13910 es fiable sólo como un test de exclusión de malabsorción a la lactosa, antes de los 6 años.

3-Los resultados del test sugestivos de no persistencia de la lactasa no ofrecen información sobre si el paciente tiene síntomas después de la sobrecarga oral de lactosa ni tampoco puede excluir las causas secundarias de hipolactasia.

5.7.5. Conclusiones sobre la interpretación del test genético

La identificación de una variante de ADN asociada con la persistencia/no persistencia de la lactasa facilitó los estudios de asociación a larga escala sobre el papel de la persistencia/no persistencia de la lactasa en las enfermedades humanas. El test molecular genético y los estudios epidemiológicos de la variante se utilizaron para entender la evolución de la persistencia de la lactasa en los humanos y para trazar el origen de la mutación en la historia de la humanidad (Sibley-2004).

El *screening* de la hipolactasia de tipo adulto en la atención primaria es importante en el diagnóstico de los síntomas abdominales en poblaciones genéticamente similares con aquellas del norte europeo y en las cuales la prevalencia de la hipolactasia de tipo adulto es relativamente alta y el consumo de productos lácteos es común (Järvelä-2005).

En conclusión, el análisis del polimorfismo C/T-13910 podría ser un instrumento clínico útil en el diagnóstico de los pacientes con no persistencia de la lactasa. Si se considera que el test BH₂T como el “estándar clínico de oro” en el diagnóstico de la deficiencia de la lactasa, entonces la sensibilidad y la especificidad del test de ADN son de 100% y de 75,5%, respectivamente, en comparación con el BH₂T, con un valor predictivo positivo para la no persistencia de la lactasa de 87,6% y un valor predictivo negativo del test de ADN, más alta, de 100%. Entonces, el test de ADN podría excluir la presencia de la malabsorción a la lactosa, según nuestros resultados.

Estos datos apoyan nuestra recomendación que el genotipado de la variante c.1993+327C>T se debería usar, en consecuencia, como un instrumento de primera línea en el diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto.

Los síntomas se deberían evaluar hasta las 48 horas después de la ingesta de 50 g de lactosa, utilizando un cuestionario de síntomas auto-reportados. La falta de necesidad de un test de lactosa para los pacientes con el genotipo CC/GG evita la aparición de unas reacciones severas en estas personas. Solamente los pacientes con los genotipos CT/GA y TT/AA deberían pasar por el test de hidrógeno espirado para diagnosticar la intolerancia a la lactosa.

Este procedimiento tiene el potencial de ser coste-efectivo, pero esto no fue el objetivo de nuestro estudio y se debería evaluar en investigaciones futuras. La utilidad de esta detección genética dependería últimamente de problemas como el coste, después de la confirmación de la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo en grandes ensayos con muestras no seleccionadas, de poblaciones de razas y étnias diferentes.

Además, la determinación de la variante de ADN c.1993+327C>T en combinación con el BH₂T permite, por primera vez, la diferenciación entre la hipolactasia primaria y secundaria. La introducción de este test en la práctica clínica debería mejorar la técnica de diagnóstico, haciéndola más efectiva para los pacientes con sospecha de hipolactasia.

CONCLUSIONES

1. En los niños y adolescentes de Galicia estudiados, así como también en la población general gallega control, se encontraron las dos variantes polimórficas relacionadas con el fenotipo de persistencia y no persistencia de la lactasa, C/T-13910 y G/A-22018.

2. En la población general gallega, utilizando las dos variantes polimórficas C/T-13910 y G/A-22018 asociadas a la hipolactasia de tipo adulto, se demostró en un 38,3% el genotipo GG + CC, que se asocia con la malabsorción a la lactosa, porcentaje similar al observado mediante el test de hidrógeno espirado en Galicia (38,4% de personas con alteraciones del metabolismo de la lactosa).

3. La frecuencia del alelo C (variante C/T-13910) es superior tanto en los casos como en los controles (0,972 y 0,587, respectivamente) a la frecuencia del alelo G de la variante G/A-22018 (0,966 y 0,575, respectivamente).

4. Los parámetros que miden la validez y la fiabilidad de la prueba genética para diagnosticar la hipolactasia de tipo adulto (teniendo en cuenta las dos variantes juntas y considerando el genotipo CC + GG como positivo y los otros genotipos AG + TC, AA + TT y AG + CC como negativos), presentan los siguientes valores: sensibilidad de 88,29%, especificidad de 95%, valor predictivo positivo 97,64%, valor predictivo negativo de 77,55% y valor global de la prueba 90,29%.

5. En el caso del polimorfismo C/T-13910 y considerando el genotipo CC como positivo y los genotipos CT y TT como negativos, se han obtenido los siguientes valores para los parámetros de validez de la prueba genética que diagnostica la hipolactasia de tipo adulto: sensibilidad 100%, especificidad 75,51%, valor predictivo positivo 87,62%, valor predictivo negativo 100% y valor global de la prueba de 91,04%.

6. En el caso del polimorfismo G/A-22018 y considerando el genotipo GG como positivo y los genotipos GA y AA como negativos, se han obtenido los siguientes valores para los parámetros de validez de la prueba genética que diagnostica la hipolactasia de tipo adulto: sensibilidad 94,68%, especificidad 87,50%, valor predictivo positivo 94,68%, valor predictivo negativo 87,50%, valor global de la prueba 92,53%.

7. Los parámetros que miden la validez y la fiabilidad de la prueba genética para diagnosticar la intolerancia a la lactosa (teniendo en cuenta las dos variantes juntas y considerando el genotipo CC + GG como positivo y los otros genotipos AG + TC, AA + TT y AG + CC como negativos), presentan los siguientes valores: sensibilidad de 85,92%,

especificidad de 46,03%, valor predictivo positivo 63,83% y valor predictivo negativo de 72,5%.

8. En el caso del polimorfismo C/T-13910 y considerando el genotipo CC como positivo y los genotipos CT y TT como negativos, se han obtenido los siguientes valores para los parámetros de validez de la prueba genética que diagnostica la intolerancia a la lactosa: sensibilidad 85,92%, especificidad 42,86%, valor predictivo positivo 62,89% y valor predictivo negativo 72,97%.

9. En el caso del polimorfismo G/A-22018 y considerando el genotipo GG como positivo y los genotipos GA y AA como negativos, se han obtenido los siguientes valores para los parámetros de validez de la prueba genética que diagnostica la intolerancia a la lactosa: sensibilidad 85,92%, especificidad 46,03%, valor predictivo positivo 63,83% y valor predictivo negativo 72,5%.

10. La sensibilidad de la prueba genética, utilizando la variante polimórfica C/T-13910 para el diagnóstico de la malabsorción a la lactosa, es de 100% en los niños gallegos mayores de 6 años, la edad del inicio de expresión de la hipolactasia de tipo adulto en Galicia.

11. La frecuencia de los polimorfismos GG + CC que se asocian con la malabsorción a la lactosa en la muestra poblacional genotipada de Noruega, Grecia, Mozambique y Taiwán fue de 6,7%, 81,8%, 98,2 % y 100% respectivamente, lo que guarda una estrecha relación con los porcentajes de hipolactasia de tipo adulto demostrados por el test de hidrógeno espirado y el test oral de tolerancia a la lactosa en dichas poblaciones, confirmándose la interrelación entre estos polimorfismos genéticos y la distribución geográfica de la hipolactasia de tipo adulto.

12. Las dos variantes relacionadas con el fenotipo de persistencia/no persistencia de la lactasa, C/T-13910 y G/A-22018, se pueden utilizar para el diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto en la población gallega.

BIBLIOGRAFÍA

Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 2004;80:245-56.

Arola H, Koivula T. Simple urinary test for lactose malabsorption. *Lancet* 1982;2:524-5.

Arola H. Hipolactasia (Lactase restriction)-a normal condition for the adult. *Dig Dis* 1989;7:301-8.

Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;202:21-5.

Arola H, Koivula T, Jokela H, Jauhiainen M, Keyrilainen O, et al. Comparison of indirect diagnostic methods for hipolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:351-7.

Arribas JC, Herrero AG, Martin-Lomas M, Canada FJ, He S, et al. Differential mechanism based on labeling and unequivocal activity assignement of the two active sites of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. *Eur J Biochem* 2000;267:6996-7005.

Auki K. A stochastic model of gene-culture coevolution suggested by the culture-historical hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2929-33.

Barr RG, Levine MD, Watkins JB. Recurrent abdominal pain of childhood due to lactose intolerance. A prospective study. *N Engl J Med* 1979;300:1449-52.

Barr RG, Watkins JB, Perman JA. Mucosal function and breath hydrogen excretion: comparative studies in the clinical evaluation of children with non-specific abdominal complaints. *Pediatrics* 1981;68:526-33.

Barillas C, Solomons NW. Effective reduction of lactose maldigestion in preschool children by direct addition of beta-galactosidases to milk at mealtime. *Pediatrics* 1987;79:766-72.

Bayless TM, Rosensweig NS. A racial difference in the incidence of lactase deficiency: a survey of milk intolerance and lactase deficiency in healthy males. *JAMA* 1966;197:968-72.

Bayless TM, Rothfeld B, Massa C, Wise L, Paige D, Bedine MS. Lactose and milk intolerance: clincical implications. *N Engl J Med* 1975;292:1156-9.

Bedine MS, Bayless TM. Intolerance to small amounts of lactose by individuals with low lactase levels. *Gastroenterology* 1973;65:735-43.

Beja-Pereira A, Luikart G, England PR, Bradley DG, Jann OC, Bertorelle G, et al. Gene-culture evolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nat Genet* 2003;35:311-3.

Bengtsson B, Oteen B. Does lactose intake induce cataract in man? *Lancet* 1984;1:1293-4.

Bergoz R, De Peyer R. Lactase intestinale et consommation de lait avant et après gastrectomie. *Schweiz Med Wochenschr* 1979;109:605-6.

Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N, Vanderploeg T, Schaffner SF, Drake J. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet* 2004;74:1111-20.

Bianchi G, Parente F, Sanagaletti O. Lactose intolerance in adults with chronic unspecific abdominal complaints. *Hepatogastroenterology* 1983;30:254-7.

Black RE, Williams SM, Jones IE, et al. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *Am J Clin Nutr* 2002;76:675-80.

Biller JA, King S, Rosenthal A, Grand RJ. Efficacy of lactase-treated milk for lactose-intolerant pediatric patients. *J Pediatr* 1987;111:91-4.

Birlouez-Aragon I, Alloussi S, Morawiec M, Fevrier C. The effects of 5% and 25% galactose diets on lens polyols, glutathione and protein glycation in male and female pigs. *Curr Eye Res* 1989;8:449-57.

Birlouez-Aragon I, Ravelontseho L, Villate-Cathelineau G, Abitbol G. Disturbed galactose metabolism in elderly and diabetic humans is associated with cataract formation. *J Nutr* 1993;123:1370-6.

Bjorneklett A, Jenssen E. Relationships between hydrogen (H₂) and methane (CH₄) production in man. *Scand J Gastroenterol* 1982;17:985-92.

Black RE, Williams SM, Jones IE, et al. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *Am J Clin Nutr* 2002;76:675–80.

Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet*. 1991;48:889-902.

Bond JH, Levitt MD. Quantitative measurement of lactose absorption. *Gastroenterology* 1976;70:1058-62.

Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler EM, et al. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-50.

Bohmer CJ, Tuynman HA. The clinical relevance of lactose malabsorption in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;67:1013.

Bohmer CJM, Tuynman HAR. The effect of a lactose-restricted diet in patients with a positive lactose tolerance test, earlier diagnosed as irritable bowel syndrome: a 5-year follow-up study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:941-4.

Bourlioux P, Pochart P. Nutritional and health properties of yogurt. *World Rev Nutr Diet* 1988;56:217-58.

Briet F, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Arrigoni E, Rambaud JC. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut* 1997;41:632-5.

Buchowski MS, Semanya J, Johnson AO. Dietary calcium intake in lactose maldigesting intolerant and tolerant African-American women. *J Am Coll Nutr* 2002;21:47-54.

Buller HA, Grand RJ. Lactose intolerance. *Annu Rev Med* 1990;41:141-8.

Büning C, Ockenga J, Kruger S, et al. The C/C-13910 and G/G-22018 genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:538-42.

Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler EM. Introducing genetic test for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-50.

Caballero B, Solomons NW, Torún B. Fecal reducing substances and breath hydrogen excretion, an indicators of carbohydrate malabsorption. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:487-90.

Calloway DH, Murphy EC. The use of expired air to measure intestinal gas formation. *Ann N Y Acad Sci* 1968;156:82-95.

Calloway DH, Murphy EC. Determination of lactose intolerance by breath analysis. *Am J Dig Dis* 1969;14:811-5.

Campbell AK, Matthews SB. Lactose intolerance and the MATHS syndrome: what are they and how can I cope. Pembrokeshire: Welston Press, 2001.

Carroccio A, Montalto G, Cavera G, et al. Lactose intolerance and self-reported milk intolerance: relationship with lactose maldigestion and nutrient intake. *J Am Coll Nutr*. 1998;17:631-6.

Caskey DA, Payne-Bose D, Welsh JD, Gearhart HL, Nance MK, Morrison RD: Effects of age on lactose malabsorption in Oklahoma native Americans as determined by breath H₂ analysis. *Dig Dis* 1977; 22:113–6.

Cavalli-Sforza LT, Strata A. Double-blind study on the tolerance of four types of milk in lactose malabsorbers and absorbers. *Hum Nutr Clin* 1987;41:19-30.

Chen YT, Mattison DR, Feigenbaum L. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet in galactose. *Science* 1981;214:1145–7.

Cook G, Kajubi S. Tribal incidence of lactase deficiency in Uganda. *Lancet*. 1966;1:725-9.

Corazza GR, Benati G, Sorge M, Strocchi A, Calza G, Gasbarrini G. β -Galactosidase from *Aspergillus niger* in adult lactose malabsorption: a double-blind crossover study. *Aliment Pharmacol Ther* 1992;6:61-6.

Corazza GR, Benati G, Di Sario A, Tarozzi C, Strocchi A, Passeri M, et al. Lactose intolerance and bone mass in postmenopausal Italian women. *Br J Nutr* 1995;73:479-87.

Cramer DW. Lactase persistence and milk consumption as determinants of ovarian cancer risk. *Am J Epidemiol* 1989;130:904-10.

Cramer DW, Xu H, Sahi T. Adult hypolactasia, milk consumption, and age-specific fertility. *Am J Epidemiol* 1994;139:282-9.

Cramer DW, Greenberg ER, Titus-Ernstoff L, Liberman RF, Welch WR, Li E, et al. A case-control study of galactose consumption and metabolism in relation to ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:95-101.

Cuatrecasas P, Lockwood DH, Caldwell JR. Lactase deficiency in the adult. A common occurrence: *Lancet* 1965;i:14-8.

Cuddewec Y, Delbruck H. Distribution of the adult lactose phenotypes-lactose absorber and malabsorber- in a group of 131 army recruits. *Gastroenterol Clin Biol* 1982;6:398-401.

de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, et al. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001;73(Suppl 2):421-9.

DiPalma JA, Narvaez RN. Prediction of lactose malabsorption in referral patients. *Dig Dis Sci* 1988;33:303-7.

DiPalma JA, Collins MS. Enzyme replacement for lactose malabsorption using a beta-D-galactosidase. *J Clin Gastroenterol* 1989;11:290-3.

Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Cecchetti L, Minguzzi L, et al. Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass. *Gastroenterology* 2002;122:1793-9.

Doobins WO, Herrero BA. Morphologic alterations associated with neomycin induced malabsorption. *Am J Med Sci* 1968;255:63-7.

Douwes AC, Fernandes J, Degenhart HJ. Improved accuracy of lactose tolerance test in children, using expired H₂ measurement. *Arch Dis Child* 1978;53:939-42.

- Douwes AC, Schaap C. Hydrogen breath test in schoolchildren . Arch Dis Child 1985;60:333-7.
- Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, Temple RD, Talley NJ, Thompson WG, et al. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. Dig Dis Sci 1993;38:1569-80.
- Duncan A, Hill PG, A UK survey of laboratory-based gastrointestinal investigation. Ann Clin Biochem 2001;35:492-503.
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hipolactasia. Nature Genet 2002;30:233-7.
- Enattah NS, Forsblom C, Rasinperä H, Tuomi TM, Groop PH, Järvelä I, et al. The genetic variant of lactose malabsorption C(-13910)T as a risk factor for type 1 and 2 diabetes in the Finnish population. Eur J Clin Nutr. 2004;58:1319-22.
- Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, Kontula K, Järvelä I. The genetic variant of lactose malabsorption is associated with fractures in very old age. J Am Geriatr Soc 2005;53:79-82.
- Escher JC, De Koning N, Ven Engen C, Arora S, Büler HA, et al. Molecular basis of lactase levels in adult humans. J Clin Invest 1992;89:480-3.
- Escribano Jubias J. Hipolactasia primaria tipo adulto en la Comarca de Cinca Medio. Pamplona. Tesis doctoral. 1990.
- Fajardo O, Naim NY, Lacey SW. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. Gastroenterology 1994;106:1233-41.
- Fang R, Santiago NA, Olds LC, Sibley E. The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. Gastroenterology 2000;118:115-27.
- Fang R, Olds LC, Santiago NA, Sibley E. GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G58-67.

Fauchi AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. Disorders of the gastrointestinal system. In: Harrison Principles of internal medicine. 14th ed New York: Mc Graw Hill, 1998:631.

Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. On the theory of evolution under genetic and cultural transmission with application to the lactose absorption problem. In: Mathematical Evolutionary Theory (ed. MW Feldman), pp 145-173. Princeton University Press. 1989. Princeton NJ.

Flatz G, Rotthauwe HW: Lactose nutrition and natural selection. Lancet 1973;2:76-7.

Flatz G, Howell JN, Doench J, Flatz SD. Distribution of physiological adult lactase phenotypes, lactose absorber and malabsorber in Germany. Hum Genet 1982;62:152-7.

Flatz G, Czeizel A. Pulmonary hydrogen and methane excretion following ingestion of an inabsorbable carbohydrate: a study of twins. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1985;4:936-41.

Flatz G. Genetics of lactose digestion in humans. 1987. In: Harris H, Hirschhorn K (eds) Advances in human genetics. Vol 16. Plenum Press, New York, pp 1-77.

Fontana M, Luppino F, Monti S, Tanga F, Paccagnini S, Bertoni G. Adult intestinal lactose absorption and idiopathic senile or presenile cataract: Lack of association. Nutr Res 1995;15:9-13.

Freund JN, Torp N, Duluc I, et al. Comparative expression of the ARNm for three intestinal hydrolases during postnatal development in the rat. Cell Mol Biol 1990;36:729-36.

Garza C, Scrinshaw NS. Relationship of lactose intolerance to milk intolerance in young children. Am J Clin Nutr 1976;29:192-6.

Gilat T, Russo S, Gelman-Malachi E, Aldor TA. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. Gastroenterology 1972;62:1125-7.

Gilat T, Ben Hur H, Gelman-Malachi E, Terdiman R, Peled Y. Alterations of the colonic flora and their effect on the hydrogen breath test. Gut 1978;19:602-5.

Goulding A, Taylor RW, Keil D, Gold E, Lewis-Barned NJ, Williams SM. Lactose malabsorption and rate of bone loss in older women. Age Ageing 1999;28:175-80.

- Gorbach SL. Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med* 1990;22:37-41.
- Grimbacher B, Peters T, Peter H-H. Lactose-intolerance may induce severe chronic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:516-8.
- Gudman-Hoyer E, Simony K. Individual sensitivity to lactose in lactose malabsorption. *Am J Dig Dis* 1977;22:177-81.
- Gugatschka M, Dobnig H, Fahrleitner-Pammer A, Pietschmann P, Kudlacek S, Strele A, Obermeyer-Pietsch B. Molecularly-defined lactose malabsorption, milk consumption and anthropometric differences in adult males. *QJM* 2005;98(12):857-63.
- Hammer HF, Petritsch W, Pristautz H, Krejs GJ. Assessment of the influence of hydrogen nonexcretion on the usefulness of the hydrogen breath test and lactose tolerance test. *Wien Klin Wochenschr* 1996;108:137-41.
- Harvey CB, Fox MF, Jeggo PA, Mantei N, Povey S, et al. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. *Ann Hum Genet* 1993;57:179-85.
- Harvey CB, Pratt WS, Islam I, Whitehouse DB, Swallow DM. DNA polymorphism in the lactase gene. Linkage disequilibrium across the 70-kb region. *Eur J Hum Genet* 1995;3:27-41.
- Harvey CB, Hollox EJ, Poulter M, Wang Y, Rossi M, et al. Lactase haplotype frequencies in Caucasians: association with the lactase persistence/non-persistence polymorphism. *Ann Hum Genet* 1998;62:215-23.
- Haverberg L, Kwon PH, Scrimshaw NS. Comparative tolerance of adolescents of differing ethnic backgrounds to lactose-containing and lactose-free dairy drinks. I. Initial experience with a double-blind procedure. *Am J Clin Nutr* 1980;33:17-21.
- He T, Priebe MG, Harmsen HJM, Stelaard F, Xiaohong S, Welling GW, Vonk RJ. Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *J Nutr* 2006;136:58-63.
- Herrington LJ, Weiss NS, Beresford SA, Stanford JL, Wolfla DM, Feng Z, et al. Lactose and galactose intake and metabolism in relation to the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1995;141:407-16.

Hertzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1996;64:232-6.

Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc* 2003;103:582-7.

Ho MW, Povey S, Swallow D. Lactase polymorphism in adult British natives: estimating alleles frequencies by enzyme assays in autopsy samples. *Am J Hum Genet* 1982;34:650-7.

Högenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:371-6.

Holden C, Mace R. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Hum Biol* 1997;69:605-28.

Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, et al. Lactose haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 2001;68:160-72.

Hollox EJ, Swallow DM. Lactase deficiency-biological and medical aspects of the adult human lactase polymorphism. In: *Genetic basis of common diseases*. 2002. (eds. RA King, JJ Totter, AG Motulsky). Oxford University Press, Oxford.

Horowitz M, Wishart J, Mundy L, et al. Lactose and calcium absorption in postmenopausal osteoporosis. *Arch Intern Med* 1987;147:534-6.

Hove H, Norgaard H, Mortensen PB. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:339-50.

Högenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:371-6.

Jackson KA, Savaiano DA. Lactose maldigestion, calcium intake and osteoporosis in African-, Asian-, and Hispanic-Americans. *J Am Coll Nutr* 2001;20:198S-207S.

Järvelä I, Enattah NS, Kokkonen J, Varilo T, Savilathi E, et al. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am J Hum Genet* 1998;63:1078-85.

Järvelä IE. Molecular genetics of adult-type hypolactasia. *Ann Med* 2005;37:179-85.

Jarvinen RM, Loukaskorpi M, Uusitupa MI. Tolerance of symptomatic lactose malabsorbers to lactose in milk chocolate. *Eur J Clin Nutr* 2003;33:701-5.

Jarvis KK, Miller GD. Overcoming the barrier of lactose intolerance to reduce health disparities. *J Natl Med Assoc* 2002;94:55-66.

Jobling MA, Hurles ME, Tyler-Smith C. *Human Evolutionary Genetics. Origins, Peoples, and Disease.* 2004. Garland Publishing, New York.

Johnson AO, Semanya JG, Buchowski MS, Enwonwu CO, Scrimshaw NS. Adaptation of lactose maldigesters to continued milk intakes. *Am J Clin Nutr* 1993;58:879-81.

Johnson AO, Semanya JG, Buchowski MS, Enwonwu CO, Scrimshaw NS. Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance, and milk intolerance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:399–401.

Joseph F, Rosenberg AJ. Breath hydrogen testing: diseased versus normal patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:787-91.

Jussila J, Launiala K, Gorbатов O. Lactase deficiency and a lactose free diet in patients with unspecific abdominal complaints. *Acta Med Scand.* 1969a;186:217-22.

Jussila J: Milk intolerance and lactose malabsorption in hospital patients and young servicemen in Finland. *Ann Clin Res* 1969b;1:199–207.

Kanaghinis T, Hatzionnou J. Primary lactase deficiency in Greek adults. *Am J Dig Dis* 1974;19:1021-7.

Kaufman FR, Kogut MD, Donnell GN, Goebelsman U, March C, Koch R. Hypergonadotropic hypogonadism in female patients with galactosemia. *N Engl J Med* 1981;304:994–8.

- Kechrid RM, Adrian J, Poiffait A: Galactose metabolism in male and female rats. II. Eye-ball differences. *Int J Vit Nutr Res* 1986;56:269–73.
- Keller P, Zecca L, Boukamel R, Zwicker E, Gloor S, et al. Furin, PC1/3, and/or PC6A process-phlorizin hydrolase to the 180-kDa intermediate. *J Biol Chem* 1995;270:25772-8.
- Kellow JE, Phillips SF, Miller LJ, et al. Dysmotility of the small intestine in irritable bowel syndrome. *Gut* 1988;29:1236-43.
- Keusch GT, Troncale FJ, Miller LH, et al. Acquired lactose malabsorption in Thai children. *Pediatrics* 1969;43:540–5.
- Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA. Yogurt-an autodigestive source of lactase. *N Engl J Med* 1984;310:1-3.
- Krasinski SD, Estrada G, Yeh KY, et al. Transcriptional regulation of intestinal hydrolase biosynthesis during postnatal development in rats. *Am J Physiol* 1994;267:G584-94.
- Krasinski SD, Van Wering HM, Tannemaat MR, Grand RJ. Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G69-84.
- Krause J, Kaltbeitzler I, Erckenbrecht JF: Lactose malabsorption produces more symptoms in women than in men. *Gastroenterology* 1996;110(Suppl):A339.
- Kretchmer N, Ransome-Kuti O, Hurwitz R, Dungy C, Alakjia W. Intestinal absorption of lactose in Nigerian ethnic groups. *Lancet* 1971;2:392-5.
- Kruse TA, Bolund L, Grzeschik K-H, Ropers HH, Sjöström H, Noren O, et al. The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *FEBS Lett* 1988;240:123-6.
- Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilathi E, Orpana A, et al. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003;52:647-52.

Kuokkanen M, Bützow R, Rasinperä H, Medrek K, Nilbert M, Malander S, et al. Lactase persistence and ovarian carcinoma risk in Finland, Poland and Sweden. *Int J Cancer* 2005;117(1):90-4.

Kushi LH, Mink PJ, Folsom AR, Anderson KE, Zheng W, Lazovich A, Sellers TA. Prospective study of diet and ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1999;149:21-3.

Labayen I, Forga L, Gonzalez A, Lenoir-Wijnkoop I, Nutr R, Martínez JA. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after daily consumption. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:543-9.

Lacey SW, Naim HY, Magness RR, et al. Expression of lactase-phlorizin hydrolase in sheep is regulated at the RNA level. *Biochem J* 1994;302:929-35.

Ladas S, Papanikos J. Lactose malabsorption in Greek adults: correlation of small bowel transit time with the severity of lactose intolerance. *Gut* 1982;23:968-73.

Ladas SD, Katsiyiannaki-Latoufi E, Raptis SA. Lactose maldigestion and milk intolerance in healthy Greek school-children. *Am J Clin Nutr* 1991;53(3):676-80.

Lebenthal E, Rosse TM. Lactose malabsorption and intolerance. In: Lebenthal E, ed. *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*. New York: Raven Press, 1981.

Leichter J. Comparison of whole milk and skim milk with aqueous lactose solution in lactose tolerance testing. *Am J Clin Nutr* 1973;26:393-6.

Leis R. Estudio de la incidencia de alteraciones del metabolismo de la lactosa en la población de Galicia. Santiago de Compostela. Tesis doctoral. 1992.

Lerebours E, Ndam CN, Lavoine A, Hellot MF, Antoine JM, Colin R. Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effects of short-term and long term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity and lactase-deficient subjects. *Am J Clin Nutr* 1989;49:823-7.

Levitt MD. Production and excretion of hydrogen gas in man. *N Engl J Med* 1969;281:122-7.

Levitt MD, Donaldson RM. Use of respiratory hydrogen (H₂) excretion to detect carbohydrate malabsorption. *J Lab Clin Med* 1970;75:937-45.

Lifschitz CH. Breath hydrogen testing in infants with diarrhea. In: Lifschitz F, editors. Carbohydrate intolerance in infancy. New York: Dekker. 1982;3:31-42.

Lin MY, DiPalma JA, Martini MC, Gross CJ, Harlander SK, Savaiano DA. Comparative effects of exogenous lactase (beta-galactosidase) preparations on in vivo lactose digestion. *Dig Dis Sci* 1993;38:2022-7.

Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. *Dig Dis Sci* 1998;43:133-7.

Lisker R, Gonzalez B, Daltabuit M. Recessive inheritance of the adult type of intestinal lactase deficiency. *Am J Hum Genet* 1975;27:662-4.

Lisker R, Cervantes G, Pérez-Bricenno R, Alva G: Lack of relationship between lactose absorption and senile cataracts. *Ann Ophthalmol* 1988;20:436–8.

Llewelyn DH, Roderick L, Sheik N, et al. Calcium stress induces calcioreticulín gene expression. *Biochem J* 1996;318:400-10.

Lovelace HY, Barr SRD. Diagnosis, symptoms, and calcium intakes of individuals with self-reported lactose intolerance. *J Am Col Nutr* 2005;24(1):51-7.

Mackey AD; Henderson GN, Gregory JF 3rd. Enzymatic hydrolysis of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside is catalyzed by intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem* 2002;277:26858-64.

Maggi R, Sayagues B, Fernández A, Romero B, Barusso P, Hernández C et al. Lactose malabsorption and intolerance in Uruguayan population by breath hydrogen test. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987;6:373-6.

Maiuri L, Raia V, Potter J, Swallow D, Ho MW, et al. Mosaic pattern of lactase expression by villous enterocytes in human adult-type hipolactasia. *Gastroenterology* 1991;100:359-69.

Maiuri L, Rossi M, Raia V, Garipoli V, Hughes LA, et al. Mosaic regulation of lactase in human adult-type hipolactasia. *Gastroenterology* 1994;107:54-60.

Martini MC, Savaiano DA. Reduced intolerance symptoms from lactose consumed during a meal. *Am J Clin Nutr* 1988;47:57-60.

Matthews SB, Campbell AK. When sugar is not so sweet. *Lancet* 2000a;355:1309.

Matthews SB, Campbell AK. Neuromuscular symptoms associated with lactose intolerance. *Lancet* 2000b;356:511.

Matthews SB, Campell AK. Lactose intolerance in the young: a new perspective. *Welsh Paediatric J* 2004;20:56-66.

Matthews SB, Waud JP, Robrets AG, Campbell AK. Sysytemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 2005;81:167-173.

McBean LD, Miller GD. Allaying fears and fallacies about lactose intolerance. *J Am Diet Assoc* 1998;98:671-6.

McDonough FE, Hitchins AD, Wong NP, Wells P, Bodwell CE. Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons. *Am J Clin Nutr* 1987;45:570-4.

McGill DB. Diagnsotic tests for lactase deficiency. In: *Milk intolerances and rejection*. Karger Basel, 1983:35-41.

Meloni Gf, Colombo C, La Vecchia C, Ruggiu G, Mannazzu MC, Ambrosini G, et al. Lactose absorption in patients with ovarian cancer. *A, J Epidemiol* 1999;150:183-6.

Meloni GF, Colombo C, La Vecchia C, Pacifico A, Tomasi P, Ogana A, et al. High prevalence of lactose absorbers in Northern Sardinian patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2001;73:582-5.

Mesonero JE, Gloor SM, Semenza G. Processing of human intestinal prolactase to an intermediate form by furin or by furin-like proprotein convertase. *J Biol Chem* 1998;273:29430-6.

Metneki J, Czeiezel A, Flatz S, Flatz G. A study of lactose absorption capacity in twins. *Hum Genet* 1984;67:296-300.

Metz G, Jenkins DJA, Peters JJ, Newman A, Blendis LM. Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet* 1976;I:1155-8.

Mitchelmore C, Troelsen JT, Sjöström H, Noren O. The HOXC11 homeodomain protein interacts with the lactase-phlorizin hydrolase promoter and stimulates HNF1 alpha-dependent transcription. *J Biol Chem* 1998;273:13297-306.

Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjöström H, Noren O. Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1 alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J* 2000; 346 (Part 2):529-35.

Montalto M, Nucera G, Santoro L, Curigliano V, Vastola M, Covino M et al. Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:489-93.

Montalto M, Curigliano V, Santero L, Vastola M, Cammarota G, Manna R et al. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol* 2006;12(2):187-91.

Montgomery RK, Büler HA, Rings EHHM, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEB J* 1991;5:2824-32.

Morrison WJ, Christopher NL. Low lactase levels: Evaluation of the radiology diagnosis. *Radiology* 1974;111:513-8.

Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, et al. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 2004;74:1102-10.

Mustapha A, Jiang T, Savaiano DA. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 1997;80:1537-45.

Nelis GF, Vermeeren MAP, Jansen W: Role of fructose-sorbitol malabsorption in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1990;99:1016–20.

Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta glucosidases is a critical step in the absorption and the metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003;42:29-42.

Newcomer A, McGill D. Distribution of disaccharide activity in the small bowel of normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology* 1966;51:481-8.

Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofman AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975;293:1232-6.

Newcomer AD, Hodgson SF, McGill DB, et al. Lactase deficiency: prevalence in osteoporosis. *Ann Intern Med* 1978a;89:218-20.

Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF. Tolerance to lactose among lactase deficient American Indians. *Gastroenterology* 1978b;74:44-6.

Newcomer AD, McGill DB. Clinical importance of lactase deficiency. *N Engl J Med* 1984;310:42-3.

Nielsen OH, Schiotz PO, Rasmussen SN, Krasilnikoff PA. Calcium absorption and acceptance of low-lactose milk among children with primary lactase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984;3:219-23.

Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with Pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:287-90.

Niu HC, Schoeller DA. Improved gas chromatography quantitation of breath hydrogen by normalization to respiratory carbon dioxide. *Lab Clin Med* 1979;94:755-63.

Obermeyer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res* 2004;19:42-7.

Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Mol Genet* 2003;12:2333-40.

Onwulata CI, Rao DR, Vankineni P. Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr* 1989;49:1233-7.

Ostrander CR, Cohen RS. Breath hydrogen analysis: A review of the methodologies and clinical application. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:525-33.

Paige DM, Bayless TM, Mellits ED, Davis L. Lactose malabsorption in preschool black children. *Am J Clin Nutr* 1977;30:1018-22.

Parker TJ, Woolner JT, Prevost AT et al. Irritable bowel syndrome: is the search for lactose intolerance justified? *Eur J Gastro Hepatol* 2001;13:219-25.

Payne DL, Welsh JD, Manion CV, Tsegaye A, Herd LD: Effectiveness of milk products in dietary management of lactose malabsorption. *Am J Clin Nutr* 1981;34:2711-5.

Payne DL, Welsh JD, Claypool PL. Breath hydrogen (H₂) response to carbohydrate malabsorption after exercise. *J Lab Clin Med* 1983;102:147-50.

Peña A, Peña JF. Malabsorción de la lactosa en estudiantes españoles. Tolerancia intestinal a la sobrecarga oral de lactosa. *Rev Esp Enferm Apar Dig* 1971;35:925-38.

Peña A, Peña JF. Malabsorción de la lactosa en estudiantes españoles. La curva de glucemia capilar después de la sobrecarga oral de lactosa en individuos normales. *Rev Esp Enferm Apar Dig* 1972;36:57-64.

Perman JA, Barr RG, Watkins JB. Sucrose malabsorption in children: noninvasive diagnosis by interval breath hydrogen determination. *J Pediatr* 1978;93:17-22.

Perman JA, Modler S, Olson AC. Role of pH in production of hydrogen from carbohydrates by colonic bacterial flora. Studies in vivo and in vitro. *J Clin Invest* 1981;67:643-50.

Perman JA, Modler S. Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 1984;87:1358-63.

Peuhkuri K, Vapaatalo H, Korpela R. Wide variations in the testing of lactose tolerance: results of a questionnaire study in Finnish health care centres. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:291-7.

Peuhkuri K, Vapaatalo H, Korpela R, Teuri U. Lactose intolerance-a confusing clinical diagnosis. *Am J Clin Nutr* 2000;71:600-2.

Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare CM, Peuhkuri K, et al. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Am Hum Genet* 2003;67:298-311.

Pribila BA, Hertzler SR, Martin BR, et al. Improved lactose digestion in intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy rich diet. *J Am Diet Assoc* 2000;100:524-8.

Rao DR, Bello H, Warren AP, Brown GE: Prevalence of lactose maldigestion: Influence and interaction of age, race, and sex. *Dig Dis Sci* 1994;39:1519-24.

Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Totterman N, Lindahl H. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004;53:1571-6.

Rasinperä H, Forsblom C, Enattah H, Halonen P, Salo K, Victorzon M, et al. The C/C-13910 genotype of adult-type hypolactasia is associated with an increased risk of colorectal cancer in the Finnish population. *Gut* 2005;54:391-5.

Rask Pedersen E, Jensen BH, Jensen HJ, Keldsbo IL, Hylander Moller E, Norby Rasmussen S. Lactose malabsorption and tolerance of lactose-hydrolyzed milk. A double-blind controlled crossover study. *Scand J Gastroenterol* 1982;17:861-4.

Reasoner J, Maculan TP, Rand AG, Thayer WR Jr. Clinical studies with low-lactose milk. *Am J Clin Nutr* 1981;34:54-60.

Reddy V, Pershad J. Lactase deficiency in Indians. *Am J Clin Nutr* 1972;25:114-9.

Rerat AA. Contribution of the large intestine to digestion of carbohydrates. In: *Milk intolerances and rejection*. Karger Basel, 1983:17-21.

Rinaldi E, Costagliola C, Albini L, De Rosa G, Auricchio S. High frequency of lactose absorbers among adults with idiopathic senile and presenile cataract in a population with a high prevalence of primary adult lactose malabsorption. *Lancet* 1984;1:355-7.

Rings EH, de Boer PA, Moorman AF, van Beers EH, Dekker J, Montgomery RK. Lactase gene expression during early development of rat small intestine. *Gastroenterology* 1992;103:1154-61.

Rings EH, Krasinski SD, van Beers EH, et al. Restriction of lactase gene expression along the proximal-to distal axis of rat small intestine occurs during postnatal development. *Gastroenterology* 1994;106:1223-32.

Risch HA, Jain M, Marrett LD, Howe GR: Dietary lactose intake, lactose intolerance, and the risk of epithelial ovarian cancer in southern Ontario (Canada). *Cancer Causes Control* 1994;5:540-6.

Robb TA, Goodwin DA. Faecal hydrogen production in vitro as an indicator for in vivo hydrogen producing capability in the breath hydrogen test. *Acta Paediatr Scand* 1985;74:942-4.

Rosado JL, Solomons NW, Lisker R, Bourges H. Enzyme replacement therapy for primary adult lactase deficiency. Effective reduction of lactose malabsorption and milk intolerance by direct addition of beta-galactosidase to milk at mealtime. *Gastroenterology* 1984;87:1072-82.

Rosado JL, Allen LH, Solomons NW. Milk consumption, symptom response, and lactose digestion in milk intolerance. *Am J Clin Nutr* 1987;45:1457-60.

Rosenthal A, Solomons NW. Time-course of cigarette smoke contamination of clinical hydrogen breath-analysis tests. *Clin Chem* 1983;29:1980-1.

Rossi M, Maiuri L, Fusco MI, Salvati VM, Fuccio A, et al. Lactase persistente versus decline in human adults: Multifactorial events in down-regulation after weaning. *Gastroenterology* 1997;112:1506-14.

Saavedra JM, Perman JA. Current concepts in lactose malabsorption and intolerance. *Annu Rev Nutr* 1989;9:475-502.

Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Schaffner SF, et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 2002;419:32.

Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K. Lactose malabsorption in Finnish children of school age. *Acta Paediatr Scand* 1972; 61:11-6.

Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K, Pyörälä K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet* 1973;i:823-6.

Sahi T. Lactose malabsorption in Finnish-speaking and Swedish-speaking populations in Finland. *Scand J Gastroenterol* 1974;9:303–8.

Sahi T, Launiala K. Manifestation and occurrence of selective adult-type lactose malabsorption in Finnish teenagers. A follow-up study. *Am J Dig Dis* 1978;23:699–704.

Sahi T, Launiala K, Laitinen H. Hypolactasia in a fixed cohort of young Finnish adults, a follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:865-70.

Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K. Lactose malabsorption in Finnish children of school age. *Acta Paediatr Scand* 1972;61:11-6.

Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;202:7-20.

Saltzman JR, Russell RM, Golner B, et al. A randomized trial of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 to treat lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1999;69:140-6.

Saltzberg DM, Levine GM, Lubar C. Impact of age, sex, race, and functional complaints on hydrogen (H₂) production. *Dig Dis Sci* 1988;33:308–13.

Sasaki I, M. Measurement of ¹⁴C-lactose absorption in the diagnosis of lactase deficiency. *J Lab Clin Med* 1970;76:824-35.

Sategna Guidetti C, Cruto E, Capobianco P. Breath hydrogen excretion after lactose and whole milk ingestion. *J Clin Gastroenterol* 1989;11(3):287-9.

Savaiano DA, Abou El Anouar A, Smith DE, Levitt MD. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 1984;40:1219-23.

Savaiano DA, Levitt MD: Milk intolerance and microbecontaining dairy foods. *J Dairy Sci* 1987;70:397-406.

Savaiano DA, Kotz C. Recent advances in the management of lactose intolerante. *Bol Asoc Med P Rico* 1989;81(5):188-92.

Scrimshaw N, Murray E. Prevalence of lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1086-98.

Sebastio G, Villa M, Sartorio R, Guzzeta V, Poggi V, et al. Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet* 1989;45:489-97.

Semenza G, Auricchio S, Mantei N. Small-intestinal disaccharidases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly D, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Vol 1. New York: McGraw-Hill, 2001:623-50.

Shaw AD, Davies GJ. Lactose intolerance: problems in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28:208-16.

Sherman PM. Probiotics and lactose maldigestion: *Can J Gastroenterol* 2004;18:81-2.

Sibley E. Genetic variation and lactose intolerance. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4:239-45.

Simoons F. Age of onset of lactose malabsorption. *Pediatrics* 1980;66:646-8.

Simoons FJ. A geographic approach to senile cataracts. Possible links with milk consumption, lactase activity and galatose metabolism. *Dig Dis Sci* 1982;27:257-64.

Skalka HW, Prachal JT: Presenile cataract formation and decreased activity of galactosemic enzymes. *Clin Sci* 1980;98:269-73.

Solomons NW, Viteri F. Breath hydrogen during sleep. *Lancet* 1976;2:636.

Solomons NW, Viteri F. Development of an interval sampling hydrogen (H₂) breath test for carbohydrate malabsorption in children: evidence for a circadian pattern of breath H₂ concentration. *Pediatr Res* 1978;12:816-23.

Solomons NW, Barillas C. The cut-off criterion for a positive hydrogen breath test in children: a reappraisal. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986;5:920-5.

Solomons NW, García-Ibañez R, Viteri FE. Reduced rate of breath hydrogen excretion with lactose tolerance tests in young children using whole milk. *Am J Clin Nutr* 1979;32:783-6.

Solomons NW, Guerrero AM, Torun B. Effective in vivo hydrolysis of milk lactose by beta-galactosidases in the presence of solid foods. *Am J Clin Nutr* 1985;41:222-7.

Spanidou EP, Petrakis NL. Lactose intolerance in Greeks. *Lancet* 1972;2:872.

Spodsberg N, Troelsen JT, Carlsson P, Enerback S, Sjoström H, et al. Transcriptional regulation of pig lactase-phlorizin hydrolase: involvement of HNF-1 and FREACs. *Gastroenterology* 1999;116:842-54.

Srinivasan D, Minocha A. When to suspect lactose intolerance? Symptomatic, ethnic, and laboratory clues. *Postgrad Med* 1998;104:109-23.

Stephenson LS, Latham MC. Lactose intolerance and milk consumption: the relation of tolerance to symptoms. *Am J Clin Nutr* 1974;27:296-303.

Suarez FL, Savaiano DA. Lactose digestion and tolerance in adult and elderly Asian-Americans. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1021-4.

Suarez FL, Savaiano DA, Levitt MD. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *N Engl J Med* 1995a;333:1-4.

Suarez FL, Savaiano DA, Levitt MD. Review article: the treatment of lactose intolerance. *Aliment Pharmacol Ther* 1995b;9:589-97.

Suarez F, Levitt MD. Abdominal symptoms and lactose: the discrepancy between patients' claims and the results of blinded trials. *Am J Clin Nutr* 1996;96:243-6.

Suarez FL, Savaiano D, Arbisi P, Levitt MD. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1502–6.

Suarez FL, Adshead J, Furme JK, et al. Lactose maldigestion is not an impediment to the intake of 1500 mg calcium daily as dairy products. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1118-22.

Szilagy A. Prebiotics or probiotics for lactose intolerance: a question of adaptation: *Am J Clin Nutr* 1999;70:105-6.

Swagerty DL, Walling AD, Klein RM. Lactose intolerance. *Am Fam Physician* 2002;65:1845-50.

Swallow DM, Hollox EJ. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In: *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (eds CR Scriver, Al Beaudet, WS Sly, D Valle). McGraw-Hill, New York, 2000, pp. 1651-63.

Swallow DM, Hollox EJ. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, 2000.

Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003;37:197-219.

TadesseK, Eastwood M. Breath hydrogen test and smoking. *Lancet* 1977;2:91.

Thacher TD, Fischer PR, Pettifor JM, Lawson JO, Isichei CO, reading JC, Chan GM. A comparison of calcium, vitamin D, or both for nutritional rickets in Nigerian children. *N Engl J Med* 1999; 341:563-8.

Thompson DG, Binfield P. Extraintestinal influences on exhaled breath hydrogen measurements during the investigation of gastrointestinal diseases. *Gut* 1985;26:1349-52.

Tordjman C, Mariani R. Can lactose intolerance account for abdominal pains in children? In: *Milk intolerances in rejection*. Karger Basel, 1983:51-6.

Tormo R, Infante D. Malabsorción de los hidratos de carbono en la infancia. Aplicación de la prueba de dosificación del hidrógeno en el aire espirado. Premio “Alexandre Frías i Roig” sobre Nutrición Infantil. Sociedad Catalana de Pediatría. Ed. Nestlé.1987.

Torun B, Solomons NW. Lactose malabsorption and lactose intolerance: Implications for general milk consumption. Arch Latinoam Nutr 1979;29:445-94.

Treuder R, Tebbe B, Steinhoff M, et al. Familial aquagenic urticaria associated with familial lactose intolerance. J Am Acad Dermatol 2003;47:611-3.

Troelsen JT, Olsen J, Noren O, et al. A novel intestinal trans-factor (NF-LPH1) interacts with the lactase-phlorizin hydrolase promoter and co-variates with the enzymatic activity. J Biol Chem 1992;267:20407-11.

Troelsen JT, Olsen J, Mitchelmore C, Hansen GH, Sjostrom H, et al. Two intestinal specific nuclear factors binding to the lactase-phlorizin hydrolase and sucrase-isomaltase promoters are functionally related oligomeric molecules. FEBS Lett 1994;342:297-301.

Troelsen JT, Mitchelmore C, Spodsberg N, et al. Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2. Biochem J 1997;322:833-8.

Troelsen JT, Olsen J, Moller J, ET AL. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. Gastroenterology 2003;125:1686-94.

Troelsen JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. Biochim Biophys. Acta 2005;1723:19-32.

van Wering HM, Huibregtse IL, van der Zwan SM, de Bie MS, Dowling LN, et al. Physical interaction between GATA-5 and hepatocyte nuclear factor-1 alpha results in synergistic activation of the human lactase-phlorizin hydrolase promoter. J Biol Chem. 2002a;276:59-67.

van Wering HM, Moyer L, Grand RJ, Krasinski SD. Novel interaction Cdx-2 binding sites of the lactase-phlorizin hydrolase promoter. Biochem Biophys Res Commun 2002b;299:587-93.

Vázquez C. Malabsorción de los hidratos de carbono en el niño: Malabsorción de la lactosa. An Esp Ped 1975;8:166-78.

Verhave M, Krasinski SD, Christian SI, Van Schaik S, Van DenBrink GR, Doting EM. Regulatory regions in the rat lactase-phlorizin hydrolase gene that control cell-specific expression. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 2004;39:275–85.

Vernia P, Ricciardi MR, Frandina C et al. Lactose malabsorption and irritable bowel syndrome: effect of a long term lactose-free diet. *Ital J Gastroenterol* 1995;27:117-21.

Vernia P, Marinaro V, Argnani F, Di Camillo M, Caprilli R. Self-reported milk intolerance in irritable bowel syndrome: what should we believe? *Clin Nutr* 2004;23:996-1000.

Vesa TH, Korpela RA, Sahi T. Tolerance to small amounts in lactose maldigesters. *Am J Clin Nutr* 1996;64:197-201.

VesaTH, Lember M, Korpela R. Milk fat does not affect the symptoms of lactose intolerance. *Eur J Clin* 1997;51:633-6.

Vesa TH, Seppo LM, Marteau PR, Sahi T, Korpela R. Role of irritable bowel syndrome in subjective lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1998;67:710–5.

Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 2000;19:165S-175S.

Vonk RJ, Hagedoorn RE, de Graaf R, Elzinga H, Tabak S, Yang Y et al. Digestion of so-called resistant starch sources in the human small intestine. *Am J Clin Nutr* 2000;72:432-8.

Vonk RJ, Priebe MG, Koetse HA, Stelaard F, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM et al. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *Eur J Clin Invest* 2003;33:70-5.

Zecca L, Mesonero JE, Stutz A, Poiree JC, Giudicelli J, et al. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Lett* 1998;435:225-8.

Zecca L, Mesoner JE, Gloor SM, Semenza G. Species differences in the sites of cleavage of pro-lactase to lactase supports lack of selective pressure. *Biochim Biophys Acta* 1999;1435:51-60.

Wang Y, Harvey C, Rousset M, Swallow DM. Expression of human intestinal mRNA transcripts during development: analysis by a semiquantitative RNA polymerase chain reaction method. *Pediatr Res* 1994;36:514-21.

Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, et al. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum Mol Genet* 1995;4:657-62.

Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998;114:1230-6.

Welsh JD. On the lactose tolerance test. *Gastroenterology* 1966;51:445-6.

Welsh JD, Hall WH. Gastric emptying of lactose and milk in subjects with lactose malabsorption. *Dig Dis* 1977;22:1060-3.

Welsh JD, Poley JR, Bhatia M, et al. Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology* 1978;75:847-55.

Weiss SL, Lee EA, Diamond J. Evolutionary matches of enzyme and transporter capacities to dietary substrate loads in the intestinal brush border. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2117-21.

Whitehead WE, Engel BT, Schuster MM. Irritable bowel syndrome: physiological and psychological differences between diarrhea-predominant and constipation-predominant patterns. *Dig Dis Sci* 1980;25:404-13.

Witte J, Lloyd M, Lorenzsonn V, Korsmo H, Olsen W. The biosynthetic basis of adult lactase deficiency. *J Clin Invest* 1990;86:1338-42.

Yesovitch R, Cohen A, Szilagy A. Failure to improve parameters of lactose maldigestion using the multiprobiotic product VSL3 in lactose maldigesters: a pilot study. *Can J Gastroenterol* 2004;18:83-6.